



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

Nara Hellen Campanha

Efeito da
irradiação com
microondas sobre
células de Candida
albicans

Araraquara
2005

Nara Hellen Campanha

Efeito da irradiação com
microondas sobre células
de *Candida albicans*

**Tese apresentada ao curso de Pós-
Graduação da Faculdade de Odontologia
de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do título de
Doutor em Reabilitação Oral, Área de
Concentração em Prótese**

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Denise Madalena
Palomari Spolidorio

Araraquara
2005

Campanha, Nara Hellen

Efeito da irradiação com microondas sobre células de *Candida albicans* / Nara Hellen Campanha. – Araraquara : [s.n.], 2005.
159 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari
Spolidorio

1. Microondas 2. *Candida albicans* I. Título

Banca Examinadora

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

Professora Assistente Doutora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

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

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Professor Assistente Doutor do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp.

Prof^a. Dr^a. Helena de Freitas Oliveira
Paranhos

Professora Livre Docente do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Professor da Disciplina de Saúde Pública no curso de Biomedicina das Faculdades Integradas Einstein de Limeira – FIEL

Dados Curriculares

Nara Hellen Campanha

Nascimento: 09/08/1973 – Cedral – S.P.

Filiação: Osvaldo Campanha

Ana Lucia Paulino Campanha

1991-1995: Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Barretos – Fundação Educacional de Barretos

1993: Monitoria na disciplina de Semiologia Clínica e Radiológica - Faculdade de Odontologia de Barretos

1998-2000: Estágio de Atualização na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara

2000-2001: Atualização em Odontologia Estética e Restauradora - Instituto de Odontologia Rio Preto

2002-2004: Estágio Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara

2001-2005: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível Doutorado – Reabilitação Oral – Área de Prótese, na Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicatória

Dedico esse trabalho

A **Deus**,

Que me deu a oportunidade de ser

Ao **Mestre Jesus**,

Pelo seu Evangelho de Amor

Aos **Meus Pais Osvaoldo e Ana Lúcia**,

Por viabilizarem a execução dos desígnios

de Deus na minha vida.

"Deus sabe de tudo! Basta que te deixes
conduzir por Ele, e
sintonizado com a Sua misericórdia e
sabedoria, busque
realizar o melhor, assinalando o teu
caminho com
as pegadas de luz, características de
quem se
entregou a Deus e em Deus progride."
(Joanna de Ângelis)

Agradecimento Especial

À Minha Orientadora e amiga **Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina,**
Por ter sempre ido muito além das suas obrigações
profissionais e ter sido a amiga constante. Pelo
carinho, apoio, confiança e
conhecimentos adquiridos

Aos Profs Ana Lúcia Machado, Carlos Eduardo Vergani e
Eunice Teresinha Giampaolo **pelos conhecimentos**
transmitidos, amizade, convivência e oportunidades
concedidas e, ainda, pela valiosa contribuição na
elaboração deste trabalho.
Minha eterna gratidão!

Aos meus pais **Ana Lúcia e Osvaldo** pelo apoio,
compreensão,
amor, confiança, incentivo e pelo auxílio na
minha formação moral e profissional.

Meu terno e eterno agradecimento!

"Admiramos o mundo através do que amamos."

(Lamartine)

Agradecimentos

Aos meus queridos avós Cristina e Mariano, **ainda** que na sua simplicidade, puderam oferecer apoio, amor e carinho nos projetos de minha vida,

Ao meu irmão **André Luís** e à **Carola** pelo amor e pela força. Valeu!,

Às amigas **Stela** e **Anne**, com quem eu dividi as emoções de quem convive no mesmo lar,

Aos meus colegas e ex-colegas de Curso de pós-graduação, **Alessandro, André, Eduardo, Fabiana (Biba), Fabiano, Janaína, Karin, Márcio Giampá, Márcio Mendonça, Max, Polyanna, Raphael, Renata, Roberta, Rosângela, Sabrina, Sicknan, Susana, Vanessa** e **Weber**, pela convivência amigável.

Aos colegas da atual turma de mestrandos **Ana Paula, Andrea, Anne, Carol, Carina, Andréa, Anelise, Daniela, Éwerton, João Gustavo, José Maurício, Juliana, Marcelo, Mariana, Matheus, Michel, Roberta** e **Zeca**, pela amizade,

Aos alunos e ex-alunos de iniciação científica **Jorge L. E. Okazaki, Juliana Tavelini, Rodolfo Martins Leal** e **Caio S. B. M. Oliveira** pela amizade e pela compreensão das minhas falhas,

Aos **Profs. Drs. Denise Madalena Palomari Spolidorio** da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, **Dr. Iguatemy Lourenço, Maria Tereza Pepato e Regina Célia Vendramini**, da Disciplina de Análises clínicas e **Rubens Monte** da Disciplina de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara e **Romeu Magnani** do Instituto de Química de Araraquara pela disponibilidade e valiosa contribuição para a realização deste trabalho,

Aos professores do **Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral**, pela orientação, disponibilidade e ensinamentos que favoreceram o meu crescimento profissional,

À **Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio** e ao **Prof Dr Jose Claudio Martins Segalla** diretora e vice-diretor, respectivamente, da Faculdade de Odontologia de Araraquara,

Aos **funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, especialmente às senhoras **Adelaide, Cida, Dulce, Lúcia, Malú, Marta e Sílvia** pela amizade, alegria, companheirismo e boa convivência em todos esses anos, e aos funcionários da portaria, pelo carinho e colaboração,

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela prestabilidade,

Às **funcionárias da secretaria de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo atendimento cordial e serviços prestados durante todo o curso,

Aos amigos **Andréa, Daniela, Débora, Éwerton, Fabiana, João Gustavo, José Maurício, Mariana, Max, Janaína, Polyanna, Raphael, Sabrina, Sicknan e Zeca** às "irmãs" **Cláudia, Gláucia, Karin, Maria Ercília, Renata, Rosângela e Vanessa**, pelo profundo laço de amizade que nos une e que, com certeza, vencerá as barreiras da distância e do tempo,

Às amigas **Karin, Mariana, Polyanna, Sabrina e Vanessa** pelo "teto", pela demonstração de carinho e pela ajuda nos momentos certos,

Aos companheiros Maria Pastre, Luis Fernando Pirola, Wilma Ianusckievicz, d. Janete e demais companheiros dos Centros Espíritas Redenção e Caibar Schutel de Araraquara, pelo apoio fraterno no busca comum pela reforma íntima,

Às Técnicas **Carina e Andréa** (Laboratório de Patologia) e **Valéria** (Laboratório de Bioquímica),

Aos **colegas e amigos** do laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara,

A todos os **alunos da Faculdade de Odontologia de Araraquara**,

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse trabalho,

À CAPES pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho,

À PROAPP pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho,

À senhora **Maria Lucia Carneseca Montoro** pela revisão gramatical deste trabalho,

Aos Amigos (as) que não foram aqui citados nominalmente, mas que fazem ou fizeram parte dessa minha caminhada terrena,

A **todas as pessoas** que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho e que não estão citadas nominalmente,

Meu sincero Agradecimento!

Sumário

1. Introdução	12
2. Revisão da Literatura	22
3. Proposição	79
4. Material e Método	81
5. Resultado	108
6. Discussão	120
7. Conclusão	134
8. Referências	136
9. Apêndice	148
10. Resumo	154
11. Abstract	157

1 Introdução

A *Candida albicans* e espécies correlatas vivem como comensais benignas no corpo da maioria dos seres humanos saudáveis.⁹⁵ Como patógenos oportunistas, esses microrganismos podem colonizar cavidades e penetrar nos tecidos em resposta a alterações na fisiologia do hospedeiro com funções imunológicas comprometidas.¹⁷ Todas as espécies de *Candida* possuem diferentes níveis de capacidade de adaptação a alterações relacionadas ao hospedeiro, adequando-se às respostas imunológicas e fisiológicas, a diferentes localidades no organismo e à terapia por drogas. Têm sido sugeridos como mecanismos responsáveis por essa adaptação, os processos de transformação do microrganismo para a forma de hifa, a frequência de alteração de morfologia e a modulação dos genes que expressam virulência em resposta aos estímulos ambientais.^{17,95} Além disso, a *C. albicans* expressa vários outros fatores de virulência que contribuem para sua patogenia. Esses fatores incluem a presença de biomoléculas de reconhecimento do hospedeiro (adesinas) e a produção de fosfolipases e proteases aspartil secretadas.¹⁷

Apesar das espécies de *Candida* terem sido isoladas de várias regiões do corpo humano, a cavidade bucal tem sido um dos sítios mais frequentemente colonizados.⁵⁷ A candidose bucal é uma infecção fúngica oportunista causada principalmente por *C. albicans*. Essa infecção normalmente não oferece risco à vida do paciente, e pode, em alguns casos, causar significativo desconforto, uma vez que todo o trato gastrointestinal pode ser colonizado, e, em outros casos, provocar severa infecção sanguínea, esta sim de caráter fatal.³⁵ A maioria das infecções fúngicas bucais acomete pacientes portadores de próteses totais⁶⁸, sobretudo indivíduos do gênero feminino^{72,84}, idosos de ambos os gêneros⁶⁸, ou indivíduos que apresentam cuidados de higiene bucal deficientes.⁶

A estomatite protética é uma condição patogênica eritematosa da mucosa que mantém contato com a base da prótese.¹⁶ A mucosa palatina dos pacientes

com estomatite protética apresenta-se com múltiplos pontos hiperêmicos⁵⁹, e, em casos mais avançados, podem ser observadas áreas eritematosas generalizadas e hiperplasia papilar do palato.^{16,52} Além da região palatina correspondente à área de suporte das próteses totais superiores, outras regiões podem ser acometidas pela estomatite protética, tais como as áreas de suporte de próteses parciais removíveis superiores e inferiores.^{80,107} Os sinais e sintomas dessa enfermidade podem incluir sensação de ardência, desconforto generalizado na cavidade bucal, paladar desagradável e queilite angular.^{6,54,59}

A estomatite protética é causada principalmente por fatores microbianos, especialmente *C. albicans*.¹⁰⁷ Esse microrganismo apresenta a capacidade de dimorfismo, ou seja, pode alterar sua morfologia saprófita, unicelular e freqüentemente esporulada para a forma de hifas sob determinadas alterações das condições ambientais.⁶ Embora os termos “dimorfismo” e “fungo dimórfico” sejam bem estabelecidos e comumente aceitos, a *C. albicans* tem a capacidade de adotar uma diversidade de morfologias e, portanto, poderia ser considerada como um microrganismo polimórfico ou pleomórfico.²⁰ A hifa é geralmente a forma invasiva, responsável pelo desenvolvimento da infecção freqüentemente observada em usuários de próteses⁶, embora a forma leveduriforme esteja associada tanto a estados comensais quanto a estados patológicos.⁹⁵ De acordo com Calderoni e Fonzi, em 2001¹⁷, as células leveduriformes, em brotamento ou não, também podem invadir os tecidos mucosos em áreas invaginadas, num processo que os autores denominaram “*persorption*”.

A *C. albicans* é normalmente encontrada em maior concentração na superfície interna das bases de próteses, o que indica que a resina acrílica atua como um reservatório de microrganismos.^{66,74} A adesão de leveduras à superfície da prótese é um pré-requisito para a colonização do palato, e fatores como a higienização deficiente, associados à desadaptação das próteses, conhecidamente propiciam o crescimento de *Candida sp.*⁶³ Entre os fatores etiológicos da estomatite protética pode-se citar ainda debilidade física, alergia, alteração do pH da saliva, idade, sexo, fumo, endocrinopatias, fatores metabólicos e nutricionais,

medicamentos de amplo espectro, imunossupressores, diabetes, xerostomia e deficiências nos mecanismos imunológicos.^{39,106}

Os tratamentos direcionados à estomatite protética são variados, podendo incluir terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal e procedimentos de desinfecção e higienização das próteses. A escolha de um tratamento ou a associação de mais de uma terapia são fatores a serem individualmente considerados. O grau de infecção decorrente da estomatite, as condições de saúde geral e bucal, a idade e o gênero do paciente são aspectos que devem ser avaliados quando da escolha do tratamento.¹⁰⁷ É importante ressaltar que, para qualquer situação clínica, os pacientes devem ser orientados quanto à higienização de suas próteses que, preferencialmente, não deveriam ser utilizadas durante o período noturno.¹⁶

Embora a estomatite protética causada por fungos seja normalmente tratada pela nistatina, clorexidina e pelo miconazol, esses agentes, capazes de aliviar os sintomas, não conseguem erradicar completamente os microrganismos.⁶ Além disso, é comum a infecção recorrente da mucosa por reaparecimento das cepas originais que causaram a infecção.⁷⁰ Entre os métodos utilizados com o objetivo de reduzir o número de microrganismos presentes na superfície das próteses estão: higienização por escovação, imersão em agentes químicos e utilização de enzimas.^{1,23,25,62,76,91} A escovação, associada a algum tipo de detergente, sabão ou dentifrício, é o método utilizado pela maioria dos portadores de próteses.¹² No entanto, a escovação, isoladamente, é considerada um dos métodos menos eficientes.^{21,33,93} Provavelmente a remoção mecânica dos microrganismos pela escovação é dificultada pelas irregularidades presentes na resina acrílica.²⁸ Outro fator agravante é que os pacientes mais idosos frequentemente apresentam capacidade visual reduzida e destreza manual limitada, resultando em uma higienização menos eficiente.⁴⁸

Uma vez que somente a escovação é insuficiente para o controle de biofilme das próteses, a utilização diária de agentes químicos para imersão é recomendável a fim de assegurar uma higienização correta.^{4,9,12,23,37,46,91} Entretanto vários estudos têm demonstrado que o tempo de imersão recomendado

pelos fabricantes é insuficiente para potencializar o efeito dos produtos na remoção ou eliminação dos microrganismos.⁷⁸ Entre os métodos de desinfecção de próteses, a utilização de soluções químicas, como glutaraldeído a 2%, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, iodóforo, álcool e clorexidina, tem sido recomendada.^{4,9,12,23,37,46} Entretanto, há vários inconvenientes relatados com a utilização desses agentes químicos para desinfecção de próteses. O glutaraldeído, apesar de possuir ação bactericida, não deveria ser utilizado para imersão de próteses, uma vez que pode ficar impregnado nas porosidades das resinas, resultando em efeito irritante aos tecidos bucais. A utilização de hipoclorito de sódio, efetiva para desinfecção^{85,104}, vem sendo limitada devido aos efeitos deletérios que pode ocasionar como o branqueamento das bases acrílicas e a corrosão dos componentes metálicos das próteses.¹⁶

Além da imersão em solução desinfetante, um outro método que tem sido recomendado para a desinfecção das próteses e resinas acrílicas utilizadas na sua confecção e reembasamento é a irradiação com microondas.^{6,8,34,42,77,89,94,104} As microondas localizam-se na região do espectro eletromagnético entre as ondas milimétricas (0,01 m) e as ondas de rádio (1 m) correspondendo a frequências entre 0,3 GHz e 30 GHz. Nos fornos de microondas, as ondas geradas são reguladas em frequências que podem ser absorvidas por materiais polares, os quais simplesmente absorvem a energia e tornam-se aquecidos.⁴⁸ As microondas são oscilações eletromagnéticas virtualmente ausentes no meio ambiente. Possivelmente, os organismos vivos podem não ter se adaptado a elas durante sua evolução na terra, uma vez que as microondas têm sido referidas como causadoras de uma variedade de efeitos biológicos.⁸¹ Esse tipo de radiação apresenta vantagens para ser utilizado como método de esterilização, como sua grande capacidade de penetração e rápida velocidade de aquecimento, fatores potenciais para melhorar a retenção dos constituintes termolábeis dos materiais submetidos à irradiação.⁹⁷ Há estudos que sugerem as microondas também como método para desinfecção de alimentos^{26,58}, lentes de contato⁸⁹, materiais microbiológicos laboratoriais^{11,92}, roupas íntimas contaminadas com *C. albicans*⁴⁰, lixo

hospitalar^{49,98}, corantes utilizados na indústria cosmética⁵⁵, e instrumentos utilizados em medicina^{43,90,110} e odontologia^{51,89} entre outros.⁵³

Do ponto de vista microbiológico, Roher e Bulard⁸⁹ demonstraram que a exposição de próteses contaminadas com *S. epidermis*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *B. subtilis* e *C. albicans* à radiação com microondas por 10 minutos (720 W) foi efetiva para a esterilização das próteses acopladas a um dispositivo rotacional tridimensional. Entretanto, esse dispositivo não está comercialmente disponível. Webb et al.¹⁰⁴ demonstraram que o forno de microondas caseiro convencional promoveu uma redução nos microrganismos de próteses totais inoculadas com *C. albicans* e *S. gordonii* após 6 minutos de exposição a uma potência de 350 W. Baysan et al.⁸ avaliaram a efetividade da desinfecção de materiais reembasadores resilientes contaminados com *C. albicans* e *S. aureus* utilizando três tipos de tratamento: 1) corpos-de-prova foram deixados a seco por 5 horas, 2) irradiados por microondas por 4 minutos a 650 W (a seco) e 3) imersos em solução de hipoclorito de sódio. Os três métodos demonstraram relativa eficácia, tendo o hipoclorito de sódio e a irradiação com microondas promovido maior redução na contagem de células microbianas. Mais recentemente, a energia de microondas foi utilizada como coadjuvante no tratamento de pacientes com candidose⁶, tendo sido observado que esse método foi efetivo para a desinfecção das próteses totais superiores pertencentes a esses pacientes e que a reinfecção das superfícies das próteses e a infecção da mucosa subjacente foram significativamente reduzidas nos pacientes cujas próteses foram irradiadas.

Dixon et al.³⁴ 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 *C. albicans*. Outros estudos recomendam o umedecimento dos materiais antes da irradiação em microondas para se obter uma maior efetividade na desinfecção.^{40,53}

Em estudo anterior foi verificada a efetividade da irradiação com microondas na desinfecção de resinas acrílicas indicadas para reembasamento imediato.⁷⁷ As amostras, imersas em água, foram irradiadas com uma combinação padronizada de tempo e potência (650W/6 minutos), estabelecida a

partir da análise dos resultados obtidos na literatura.^{6,8,14,34,88,89,99,104,110} Para a realização dos testes microbiológicos, foram utilizados quatro microrganismos considerados indicadores na avaliação de métodos de esterilização e desinfecção: *S. aureus* (gram positivo), *P. aeruginosa* (gram negativo), *C. albicans* (fungo) e *B. subtilis* (aeróbico esporulado).²⁴ 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 (48 horas e 7 dias).⁷⁷

Entretanto, os mecanismos pelos quais a energia de microondas atua sobre os microrganismos ainda não estão completamente esclarecidos. De acordo com Dardalhon et al.²⁷, em 1981, as microondas não são suficientemente potentes para alterar diretamente as ligações químicas, e, portanto, seus efeitos poderiam ser produzidos via mecanismos como relaxamento dielétrico, condutividade iônica, alteração dos biopolímeros. Os fornos de microondas domésticos utilizam uma frequência de 2.450 MHz que fornece comprimento de ondas rotacionais de aproximadamente 12 mm.³⁰ As moléculas de água, por serem dipolares (apresentam carga elétrica total neutra, mas têm uma porção terminal da molécula negativa e outra positivamente carregada), são capazes de interagir com a frequência do campo eletromagnético das microondas (ressonância) e, movimentando-se, têm sua direção alterada aproximadamente 2,45 milhões de vezes por segundo. Conseqüentemente, numerosas colisões intermoleculares ocorrem, e a energia rotacional é convertida em energia térmica, provocando, um rápido aquecimento.³⁰ Este aquecimento poderia causar a denaturação das proteínas e dos ácidos nucléicos celulares, uma vez que a denaturação das moléculas de DNA é maior quando realizada por meio de microondas do que por outra fonte térmica.⁹⁶ Outro fator a ser considerado é que alguns microrganismos podem apresentar um aumento intrínseco de temperatura menor do que o do meio de cultura em que estão suspensos. Disso resulta um gradiente térmico que potencializaria o efeito térmico das microondas. Essa hipótese poderia explicar a incapacidade de multiplicação dos microrganismos (cultura por plaqueamento) após a sua irradiação quando imersos em água pelo tempo de 6 minutos.⁷⁷ Por

outro lado, além da água, os microrganismos apresentam outras moléculas carregadas eletricamente, tais como os fosfolipídeos. Estas moléculas poderiam também entrar em ressonância com as microondas. Teoricamente, se a amplitude e a velocidade do movimento das moléculas ressonantes com as microondas excederem a capacidade elástica da estrutura celular a que pertencem (por exemplo, a membrana citoplasmática), haveria a lise do microrganismo.¹⁹ As mudanças estruturais na camada periférica (“solvent cage”) ao redor das macromoléculas biológicas, poderiam alterar a estabilidade e a função próprias, e, conseqüentemente, essas moléculas poderiam ser denaturadas de forma irreversível. Outras possíveis explicações incluem fenômenos na parede da membrana celular que podem envolver alteração na permeabilidade seletiva devido à ressonância molecular, o que resulta em clivagem.⁷⁹

Woo et al.¹⁰⁸, em 2000, estudaram o mecanismo de ação das microondas em dois microrganismos. Os autores avaliaram a morfologia celular, a liberação de DNA, RNA e proteínas e a contagem de microrganismos viáveis. Esses autores verificaram que a exposição de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* a 600 W de potência causou redução nas células viáveis e aumentou a liberação de DNA e de proteínas revelando uma provável lise da parede e da membrana celulares. Entretanto, esses autores não verificaram diminuição na densidade da suspensão celular após a exposição às microondas, apesar de ter havido significativa redução na contagem de células viáveis. De acordo com os autores, as células podem não ter sido completamente lisadas, mesmo após terem sido inativadas pela irradiação. Utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão, os autores observaram a presença de manchas escuras no citoplasma, nas células expostas às microondas, que foram atribuídas a aglomerados de proteínas denaturadas.

Rosaspina et al.⁹⁰, em 1994, avaliaram a morfologia superficial da *C. albicans* aderida a lâminas de bisturi após a exposição às microondas e verificaram alteração estrutural da parede celular, que aumentou proporcionalmente ao aumento do tempo de exposição. Esses autores submeteram os microrganismos à imersão em água em ebulição pelos mesmos

tempos de irradiação e verificaram que essas alterações não ocorreram com esse tipo de tratamento. Esse fato poderia ser explicado pela existência de proteínas (β 1,6–glucana, β 1,3–glucana e quitina) interconectadas por ligações covalentes nas paredes celulares dos fungos, o que lhes confere resistência e exige, para sua degradação, a utilização de meios ou agentes especiais.^{20,31,82}

Como podemos constatar pelas pesquisas realizadas até então, os autores sugerem várias hipóteses para explicar o efeito da irradiação por microondas sobre os microrganismos. Entretanto, as alterações promovidas nos microrganismos ainda não foram totalmente esclarecidas. Além disso, não foram encontrados trabalhos que investigassem parâmetros moleculares e liberação de substâncias pela destruição da *C. albicans* por irradiação de microondas.

A identificação e a observação dos microrganismos podem ser realizadas por meio de vários tipos de microscopia, densidade óptica, centrifugação e pelas características antigênicas, patogênicas e genéticas. Entretanto, o parâmetro mais utilizado para avaliação da destruição ou inativação dos microrganismos é sua incapacidade de crescimento. Além disso, a liberação de moléculas e íons intracelulares, tais como eletrólitos, DNA, RNA e proteínas, pode contribuir para a avaliação da lise celular.^{2,71,108} Dessa forma, os mecanismos de inativação dos microrganismos pelas microondas podem ser estudados em instâncias estruturais e moleculares microbianas, pela contagem das células viáveis e pela liberação de substâncias, como parâmetros de lise celular.

Os íons Ca^+ , Na^{++} e K^+ desempenham funções celulares específicas e suas concentrações em relação ao meio extracelular são mantidas por mecanismos de transporte ativos intramembranas.² A concentração desses íons, quando liberados em solução, pode ser identificada por potenciometria e eletrodos seletivos.^{2,69} Os ácidos nucleicos encontram-se nas células dentro de organelas envolvidas por membranas fosfolipídicas e, somente após a alteração dessas membranas, essas moléculas poderiam ser liberadas do microrganismo para o meio extracelular. A verificação de ácidos nucleicos de uma solução pode ser realizada diretamente em espectrofotômetro UV a 260 nm.⁶⁷ As proteínas podem ser identificadas por espectrofotometria em comprimentos de ondas específicos, de maneira direta ou

com o auxílio de corantes. ¹⁵ Bradford¹³ sugeriu o método de quantificação de proteínas em solução com o auxílio do corante Comassie azul brilhante. Essa técnica tem como base a capacidade de as proteínas se ligarem a esse corante e alterarem seu espectro de absorção. A quantidade de proteínas presentes é proporcional à absorbância obtida em espectrofotômetro a 595 nm. ^{13,65} Outro método colorimétrico de quantificação de proteínas é o Vermelho de Pirogalol, cujo reagente de cor reage com o molibdato de sódio, formando um complexo que, quando combinado com proteína em meio ácido, desenvolve um cromóforo azul, com o máximo de absorbância a 600 nm. A absorbância resultante é proporcional à concentração protéica da amostra. ¹⁰²

Independentemente do efeito da irradiação com microondas sobre microrganismos patogênicos ser de natureza molecular, mecânica ou proveniente de aquecimento seletivo, é necessário que tais efeitos sejam investigados. Assim, com base nessas considerações, a investigação dos efeitos da inativação celular microbiana pelas microondas sobre a *C. albicans* deverá contribuir para as áreas de pesquisa odontológica, bem como para o tratamento da estomatite protética.



Revisão da
literatura

2 Revisão da literatura

Olsen⁷⁹, em 1965, investigou a utilização da energia de microondas com o objetivo de reduzir a população de fungos em pães. Os esporos de três fungos comumente encontrados nesse tipo de alimento (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* e *Rhizopus nigricans*) foram cultivados em tubos contendo Agar batata dextrose e incubados durante sete dias. Os esporos obtidos por meio dessa cultura foram ressuspensos em 10 mL de água destilada contendo 0,01% de lauril sulfato de sódio sob agitação. Alíquotas dessas suspensões foram inoculadas em fatias de pães produzidos com ou sem a incorporação de conservante. As fatias de pães foram irradiadas por 2 minutos em um aparelho de microondas não convencional em uma potência de 5000 W. Após a irradiação, a região dos pães inoculada com os microrganismos foi removida, macerada e inserida em recipientes contendo 50 mL de água destilada. Os recipientes foram agitados por 10 minutos e alíquotas da solução resultante foram semeadas em placas de Petri ou tiveram o número de esporos viáveis contados em uma câmara hemocitométrica. O número de colônias e de esporos viáveis foi comparado com amostras obtidas a partir de pães não irradiados, mas que foram submetidos à mesma temperatura atingida pela irradiação. Foi observado que o número de esporos viáveis e de colônias dos três fungos avaliados reduziu significativamente após a irradiação em microondas. De acordo com o autor, foi demonstrado na literatura que as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são inativadas em temperaturas entre 54,11°C a 56,88°C, quando mantidas por 20 minutos. No entanto, a maior temperatura registrada no aparelho de microondas utilizado nesse estudo foi de 51,33°C. Considerando-se o tempo de exposição utilizado (2 minutos) e a incapacidade de as amostras de pães utilizadas reterem a temperatura atingida por tempo maior do que 5 a 10 minutos, o autor concluiu que a redução no número de esporos após a irradiação não foi provavelmente originada de um efeito térmico convencional. Além disso, foi sugerido que as soluções salinas presentes no citoplasma dos esporos podem



Revisão da

literatura

representar um alvo preferencial para a energia de microondas, o que leva a temperatura interna desses microrganismos a exceder o suficiente para promover lise ou inativação.

Pennock et al.⁸³, em 1968, examinaram três métodos turbidométricos e um método de espectrofotometria ultravioleta para estimativa de proteínas totais de fluido cerebrospinal. Para a leitura direta em luz ultravioleta a 210 nm, foram utilizados 0,1 mL de fluido cerebrospinal diluído em q.s.p. 50 mL de solução salina, utilizando-se solução salina como branco. Para o método turbidométrico, 1 mL de fluido cerebrospinal foi precipitado com 3 mL de ácido sulfosalicílico a 3%, ou 3 mL de ácido sulfosalicílico a 3%, diluído em sulfato de sódio a 7%, ou, ainda, com ácido tricloroacético a 3%. A turbidez foi medida após 10 minutos a 680 nm, utilizando-se água destilada como branco, ou em um fotômetro MRC. Solução de albumina humana foi utilizada como padrão de comparação, exceto para as estimações de ácido sulfosalicílico, as quais foram estimadas diretamente, a partir de leituras do fotômetro calibrado para proteínas totais. De acordo com os autores, o método de leitura em luz ultravioleta apresentou dificuldades com relação à necessidade de diálise de pequenas moléculas que poderiam interferir com este comprimento de onda. O método turbidométrico, que utilizou 3 mL de ácido sulfosalicílico a 3%, diluído em sulfato de sódio a 7%, foi considerado o mais confiável devido à sua estabilidade frente às alterações de concentração de proteínas das amostras. Sua leitura, de acordo com os autores pode ser realizada após dez minutos da mistura.

Carroll e Lopez¹⁹, em 1969, investigaram o efeito da energia de radiofrequência sobre os microrganismos, variando-se temperatura, pH e composição dos diferentes meios de suspensão. Para os procedimentos experimentais, foi utilizado um aparelho de microondas não convencional com potência de 500 W. Esse aparato permitiu a monitoração e o controle da temperatura e da evaporação de líquidos. Inicialmente, (Experimento I), foi avaliado o efeito da irradiação em microondas durante 46 minutos em solução tampão de diferentes pHs sobre os microrganismos testados (*B. subtilis*, *E. coli* e

Revisão da

literatura

S. cerevisiae). A investigação de possíveis efeitos térmicos sinérgicos com a radiação foi realizada por meio do aquecimento das suspensões microbianas em tampão, em banho-de-água, até que fosse atingida a temperatura em que se iniciasse a morte gradual dos microrganismos estudados, e somente, então, é que os microrganismos foram submetidos à irradiação (Experimento II). Além disso, os microrganismos também foram ressuspensos em diferentes alimentos líquidos (leite, suco de tomate e suco de laranja) e irradiados por períodos de até 64 minutos (Experimento III). Os microrganismos dos três experimentos foram semeados em placas de Petri. Os autores observaram que não houve redução significativa do número dos microrganismos testados nas soluções com diferentes valores de pH. Houve redução gradual dos microrganismos submetidos à combinação de tratamento em banho-de-água e irradiação, redução essa que foi comparável com a os microrganismos que foram somente submetidos ao tratamento em banho-de-água. 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 microrganismos com o aumento do tempo de exposição às microondas. A variabilidade dos resultados obtidos, em função do meio em que os microrganismos estavam suspensos, levou os autores a sugerirem que a composição química da suspensão irradiada e a das células microbianas pode explicar os efeitos não térmicos provenientes das microondas. Além disso, os autores relataram que existe a possibilidade de a 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, poderia ocorrer uma desnaturação irreversível dessas estruturas e os microrganismos poderiam ser inativados em níveis baixos de calor.



Revisão da

literatura

Davenport²⁸, em 1972, realizou um estudo para investigar a porosidade e a textura superficial de resinas acrílicas, processadas em contato com diferentes materiais de moldagem, de modelos, resinas, isolantes e lâminas de vidro, com o objetivo determinar que tipo de processamento poderia favorecer ou dificultar o crescimento de microrganismos. Como as amostras obtidas com materiais de moldagem não foram favoráveis para a mensuração direta, elas foram vazadas com gesso, para se realizar a análise da sua superfície. Primeiramente, as amostras foram analisadas visualmente com uma lupa com aumento de 10X para a localização de defeitos. A leitura da superfície das amostras foi realizada com perfilômetro e medidas de profundidade e largura foram realizadas. Nas amostras processadas em contato com o vidro, não foram detectadas rugosidades que permitissem mensuração devido à baixa rugosidade intrínseca da resina, independentemente se eram autopolimerizáveis ou termopolimerizáveis. Os resultados demonstraram que a profundidade de rugosidade das amostras de resina variou de 0,4 a 12 μm e a largura de 5,1 a 22,8 μm . Para efeito de comparação o autor registrou medidas de *cocci* (1 μm) e de leveduras (5 μm). A inclinação dos flancos das depressões registradas apresentou-se pouco retentiva, com características de pouca resistência ao desalojamento de microrganismos. Para análise da porosidade, foi utilizada a técnica de difusão de corante fluorescente. Não houve difusão do corante, indicando, de acordo com os autores, que, se houve porosidades, elas não estiveram abertas na superfície e que superfícies de próteses de textura fina e com ausência de porosidades não permitiriam adesão de biofilme por penetração ou por alojamento mecânico nas irregularidades.

Levin⁶¹, em 1973, avaliou a permeabilidade de uma resina acrílica termopolimerizável para base de próteses a corantes e ao microrganismo *C. albicans*, e investigou o efeito da resina acrílica estudada na alteração de pH do meio de cultura do microrganismo. Foram confeccionados corpos-de-prova de 1 cm^3 com a resina acrílica, os quais foram polidos em 3 de suas 6 faces. A seguir, os corpos-de-prova foram imersos em corante fluorescente durante 10 horas, após o que foram seccionados em camadas de 100 μm e avaliados ao microscópio sob

Revisão da

literatura

luz ultravioleta. Para a avaliação da penetração de *C. albicans* na resina, os corpos-de-prova foram esterilizados e imersos em meio de cultura contendo glicose. O microrganismo foi inoculado nesse meio de cultura e incubado por 8 semanas. Os cubos foram seccionados em camadas de 100 µm e avaliados em microscópio óptico. Durante o período de incubação, o pH do meio de cultura foi verificado semanalmente. Como controle, foram incubados cubos de resina em meio de cultura sem a presença do microrganismo, e, em outras, o pH inicial do meio de cultura foi modificado pela adição de ácido hidrocloreídrico. Os autores verificaram que a penetração do corante na resina foi maior nas faces não polidas do cubo, tendo sido observada a presença de numerosos blastósporos, e um número menor de formas vegetativas. O pH do meio de cultura sofreu um aumento após a colocação do corpo-de-prova de resina no 8º dia de incubação. Segundo o autor, o corpo-de-prova não alterou o pH do meio, a resina acrílica, em presença de *C. albicans*, aumentou esse pH e, quando somente a *C. albicans* esteve presente, o pH do meio foi reduzido. Além disso, afirmou que o tratamento da candidose oral em pacientes portadores de prótese deveria ser primeiramente direcionado para a prótese, e, secundariamente, para a mucosa.

Culkin e Fung²⁶, em 1975, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na eliminação de microrganismos presentes em alimentos líquidos 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 10^7 org/mL nos alimentos (sopa de tomate, sopa de vegetais e caldo de carne). O número de células viáveis tanto nos alimentos crus quanto cozidos, para porções individuais (200 mL), triplas (600 mL), ou porções de 375 mL contidas em um cilindro de vidro modificado, com aberturas laterais para a remoção de amostras em diferentes posições, 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

Revisão da

literatura

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 provável efeito mecânico, resultante da intensidade do campo das microondas.

Em 1976, Bradford¹³ descreveu a técnica de determinação de proteínas que recebeu o seu nome. A técnica tem como base a combinação do Comassie Azul brilhante às proteínas, alternando sua coloração inicialmente vermelha para a coloração azul, mudando, portanto o seu espectro de absorção. O autor confeccionou diferentes preparações de proteínas em soluções tampão e o reagente foi preparado pela diluição do corante em etanol com a adição de ácido fosfórico. Soluções das proteínas em tampão, nas concentrações de 1 a 10 µL/mL (microanálise) ou de 10 a 100 µL/mL (análise padrão), foram misturadas com 5 mL de reagente. A mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595 nm foi mensurada após 2 minutos e antes de 1 hora. Como referência, foi utilizada uma mistura de reagente e tampão. Uma curva padrão foi obtida pelo traçado de gráficos contendo os valores de peso de proteínas em função da absorbância encontrada. O autor encontrou diferenças de sensibilidade entre a microanálise e a análise padrão, devido provavelmente aos procedimentos de diluição. Os resultados demonstraram que houve interferência insignificante de íons Na⁺, K⁺ e de carboidratos. As únicas substâncias que apresentaram interferência

Revisão da

literatura

significativa nos resultados foram o detergente dodecil sulfato de sódio, Tritin X-100 e detergentes comerciais para vidros. O autor concluiu que essa técnica foi reproduzível e rápida, com o corante alterando seu espectro de absorção de 465 para 595, em, aproximadamente, 2 minutos.

Latimer e Matsen⁶⁰, 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 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 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 *B. stearothermophilus* presentes nas culturas puras, e que esse tempo também promoveu esterilização das placas contaminadas.

Revisão da

literatura

Fitzpatrick et al.³⁸, em 1978, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de microrganismos patogênicos, variando-se as condições de umidade e o tempo de exposição. Para os experimentos iniciais, foram utilizadas suspensões salinas de *S. aureus* contidas em tubos de ensaio, e também esporos secos ou umedecidos de *B. subtilis*. Cada condição avaliada foi submetida a 5 irradiações sucessivas por 12 segundos a 1000 W. Os resultados demonstraram que houve inativação somente do microrganismo em suspensão (*S. aureus*), tendo sido a irradiação ineficiente para inativar as formas esporuladas (*B. subtilis*). Em seguida, os autores utilizaram formas esporuladas de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* inoculados em tiras disponíveis comercialmente para verificação de efetividade de esterilização. As tiras foram umedecidas pelo período de 30 a 270 segundos, com água destilada, antes do tratamento de irradiação. Os resultados desse segundo teste demonstraram que, no tempo de exposição às microondas de até 60 segundos, houve crescimento. A partir desses resultados, os autores realizaram experimentos com tiras contaminadas com formas vegetativas dos mesmos microrganismos. Culturas desses microrganismos foram incubadas em outros tubos de ensaio abertos, ou, então, vedados com tampas rosqueáveis. Os experimentos demonstraram crescimento em todas as culturas avaliadas. Devido a essas observações, os autores realizaram experimentos com tubos de ensaio vedados, inicialmente com rolhas de borracha, e, depois, com as tampas rosqueáveis, e verificaram que não houve crescimento nas culturas avaliadas pelo período de 7 dias. Os autores concluíram que a esterilização por meio da irradiação em microondas ocorreu quando o conteúdo a ser irradiado foi adequadamente selado e apresentava água suficiente para a produção de vapor dentro dos recipientes contendo os microrganismos. Os autores afirmaram que a pressão de vapor gerada dentro dos tubos não foi suficiente para rompê-los. Além disso, com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram que a esterilização ocorrida apresentou características de efeitos puramente térmicos.

Hume e Makinson⁵¹, em 1978, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas e de óleos lubrificantes bactericidas para peças de mão na



Revisão da

literatura

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. Instrumentos 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 *H. simplex* foram irradiados por até 12 minutos. Além disso, cinco marcas comerciais de óleos lubrificantes foram aplicadas a culturas de *S. aureus* em meio líquido, as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas e avaliadas comparativamente quanto a turbidez. 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 irradiadas por 12 minutos, embora os autores tenham ressaltado que nas peças de mão não expostas às microondas, também não houve crescimento viral. Os autores atribuíram esse efeito virucida ao óleo de lubrificação das peças de mão. 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 de os microrganismos terem sido protegidos das microondas pela superfície metálica dos instrumentos odontológicos, bem como pelo fato de os 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.

Os mecanismos de ação da irradiação com microondas na inativação de microrganismos foram estudados por Vela e Wu¹⁰⁰, em 1979. Esses autores irradiaram amostras de solo, leveduras, bactérias e vírus, estando as amostras umedecidas, secas ou liofilizadas. De acordo com os resultados, as amostras liofilizadas dos microrganismos sobreviveram a altas doses de radiação, enquanto

Revisão da

literatura

que esses mesmos microrganismos foram inativados quando em presença de água. Segundo os autores, os microrganismos estudados não absorveram energia suficiente, no estado seco, para provocar redução significativa nas populações celulares, embora tenham sido expostos à irradiação por períodos prolongados de tempo. Dessa forma, a inativação celular ocorreu em função do conteúdo de água das amostras, sendo, portanto, resultado de um efeito térmico. Os autores afirmaram, ainda, que outros componentes celulares, além da água, não absorvem energia suficiente para inativar a célula microbiana ou, ainda, que se existe um efeito não-térmico esse efeito não é bactericida, embora tenham admitido que existe a possibilidade de que a água possa ser necessária para potencializar os efeitos não-térmicos.

Dreyfuss e Chipley³⁶, 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 aquecidas 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 afetam as atividades metabólicas de *S. aureus* de uma maneira que não pode ser explicada somente por efeitos térmicos.



Revisão da

literatura

Dardalhon et al.²⁷, em 1981, estudaram o possível efeito genético das microondas, em escala de hiperfrequência (9,4, 17 e de 70-75 GHz), sobre células não modificadas de *E. coli* e *S. cerevisiae* e sobre cepas sensíveis a radiações (com deficiências de reparo de DNA). Os microrganismos foram ressuspensos em 50 µL de solução salina na concentração de 8×10^7 cél/mL sobre filtros milipore colocados dentro de placas de petri abertas, contendo agar solidificado. As células foram irradiadas durante 30 min por ondas milimétricas (70-75 GHz) ou centimétricas (17 e 9,4 GHz), utilizando-se dispositivos especialmente projetados, contendo uma antena curva emissora de radiação. As irradiações dos microrganismos foram realizadas de tal maneira que os autores puderam monitorar as densidades e os níveis de potência para controlar os efeitos térmicos. A seguir, os microrganismos foram ressuspensos em 50 mL de solução salina, diluídos e plaqueados em meio sólido. Após incubação, a 30°C durante 5 dias, as colônias foram contadas. A contagem desses microrganismos foi comparada com a de microrganismos não irradiados. Os autores observaram que não houve uma redução nas curvas de sobrevivência, mesmo dos microrganismos mutantes, quando comparados aos microrganismos não irradiados. Uma redução nos índices de sobrevivência dos microrganismos, comparáveis com aqueles obtidos em temperaturas acima de 50°C não foi observada com a irradiação com microondas nas frequências estudadas. Os autores atribuíram esses resultados ao fato de o aumento de temperatura causado pelo tratamento em microondas não ter excedido 5 graus acima da temperatura ambiente. Segundo os autores, as microondas não influenciaram significativamente na sobrevivência das células, sugerindo ausência de efeitos ao DNA das mesmas.

McElderry et al.⁶⁵, em 1982, compararam seis técnicas utilizadas para a determinação de proteínas totais em urina quanto à sua linearidade, acuidade, precisão, sensibilidade e especificidade. As técnicas avaliadas foram dois métodos comerciais à base do corante Comassie Azul brilhante (Rapid-Stat e BioRad), a técnica de ligação com o corante Ponceau-S, a reação do precipitado protéico de ácido tânico com o cloreto de ferro, o método micro-turbidométrico, envolvendo



Revisão da

literatura

cloreto de benzalcônio e a versão dos autores para o método da reação de biureto-tricloroacético. Para os experimentos foram avaliadas as seguintes proteínas: albumina bovina e humana, gama-globulina, ovalbumina e lisozima, além de peptídeos de diferentes pesos moleculares. Os métodos foram utilizados de acordo com os fabricantes ou com os idealizadores. Os resultados demonstraram que o método Rapid-Stat alterou sua linearidade após a concentração de 0,6 g/L. O BioRad demonstrou pequeno desvio de linearidade para as concentrações de albumina. Todos os outros métodos demonstraram linearidade para as proteínas avaliadas e para proteínas de diversos pesos moleculares. Todas as técnicas, exceto a do biureto, demonstraram diferença entre albumina e gama-globulina nos padrões de resposta de absorvância. Para soluções com misturas de diferentes concentrações das proteínas utilizadas, foi verificado que, com exceção do biureto, todos os outros métodos apresentaram acentuada redução na sua recuperação quando se aumentou a concentração relativa de gama-globulina. Quanto à precisão, todos os métodos apresentaram alta precisão para o mesmo lote e entre lotes. Todos os métodos apresentaram boa correlação com o método do biureto. Os autores concluíram que todos os métodos avaliados apresentaram variação método-dependente na resposta de absorvância para diferentes proteínas. Sugeriram a albumina como material padrão para a análise de proteínas de urina. Afirmaram que o método do biureto permite a análise de altas concentrações de proteínas, mas apresenta baixa sensibilidade em baixas concentrações. Os autores sugeriram, ainda, que os métodos de Ponceau-S e Comassie Azul brilhante (Bio Rad) devem ser utilizados como método de rotina para análise de proteínas de urina, uma vez que ofereceram mais vantagens, entre as quais, facilidade de análise, custo, tamanho de amostra, linearidade e precisão.

Dilena et al.³², em 1983, avaliaram a linearidade, precisão e praticidade de métodos de quantificação de proteínas totais. Os métodos avaliados foram: Selected Method of the American Association for Clinical Chemistry; o método de ácido sulfosalísílico associado ao biureto; a técnica manual do Comassie Azul brilhante; o método turbidométrico de ácido sulfosalísílico associado ao sulfato de

Revisão da

literatura

sódio; turbidometria em ácido tricloroacético; e a ligação com o corante Ponceau-S. Foram analisadas soluções salinas de proteínas de 0,25 a 0,5 g/L de albumina bovina e humana, de soro bovino e humano e de soro liofilizado (Monitrol II e Wellcome Unassayed). Como padrão clínico, foram utilizadas amostras de urina humana com concentração conhecida de albumina (0,5 g/L) e como padrão laboratorial foi utilizado Ortho Control Urine II reconstituído. Além disso, foram utilizadas amostras de urina recém obtidas com concentrações baixas, médias e altas de proteína, (0,22 g/L, 0,62 g/L e 1,02 g/L). As análises foram realizadas de acordo com os idealizadores de cada um dos métodos. De acordo com os resultados, o Selected Method demonstrou o intervalo máximo de linearidade e o de turbidometria em ácido tricloroacético, o menor. Quanto ao critério precisão dentro do mesmo lote de reagentes, o método do Comassie Azul brilhante foi o menos preciso dos métodos avaliados, nas amostras com alta concentração de proteínas; nas amostras com baixa concentração, os métodos apresentaram precisão similar; e nas amostras de concentração média, o método de turbidometria em ácido acético foi considerado superior ao Selected Method. A verificação da precisão de diferentes lotes dos reagentes demonstrou que os métodos do Comassie Azul brilhante e de turbidometria, em ácido sulfosalicílico associado ao sulfato de sódio, apresentaram menor precisão, independentemente do material analisado; os métodos mais precisos foram o de ácido sulfosalicílico associado ao biureto, o de turbidometria em ácido tricloroacético e o de ligação ao corante Ponceau-S. Com relação à praticidade (tempo gasto, necessidade de equipamento, dificuldade de preparação de reagentes, habilidade necessária, tamanho da amostra e custos), o método do Comassie Azul brilhante foi considerado o mais prático, enquanto que o Selected Method foi considerado inferior a todos os outros. Os autores concluíram que o Selected Method é pouco prático e preciso, porém apresenta boa linearidade; a técnica de ácido sulfosalicílico associada ao biureto também foi considerada impraticável e não-linear, para baixas concentrações protéicas. A técnica de Comassie Azul brilhante foi considerada a técnica mais prática, apesar de sua pouca linearidade e precisão.

Revisão da

literatura

O método turbidimétrico de ácido sulfosalicílico associado ao sulfato de sódio não foi preciso e não pôde ser padronizado com amostras de origem bovina. A técnica de Ponceau-S apresentou boa performance e praticidade, e foi recomendada para utilização de rotina em laboratórios.

Rudd et al.⁹¹, em 1984, avaliaram a efetividade de um desinfetante químico à base de hipoclorito de sódio a 5,25% (Clorox) na desinfecção de próteses de resina acrílica e determinaram o tempo de imersão necessário para a desinfecção. Para o estudo, os autores confeccionaram 12 próteses totais idênticas com dentes anteriores de resina acrílica e posteriores de porcelana. As próteses foram seccionadas ao longo da linha média para a obtenção de 24 corpos-de-prova. Isolados de *S. aureus*, *B. subtilis* (formas vegetativas e esporuladas), *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus* do grupo D foram obtidos em uma concentração de 9×10^8 células/mL em meio de cultura líquido. Metade dos corpos-de-prova foram imersos nessas suspensões durante 2 minutos, num total de 2 corpos-de-prova para cada microrganismo. A seguir foram removidos do meio e permaneceram incubados até secagem. Os corpos-de-prova foram, então, submetidos ao tratamento de desinfecção em Clorox por imersão durante 1, 3 ou 5 minutos. Em seguida, foram imersos em meio de cultura e incubados a 37°C durante 5 ou 7 dias, para as formas vegetativas e esporuladas, respectivamente. O crescimento dos microrganismos foi observado por plaqueamento de alíquotas do meio de cultura em agar. Alíquotas da solução de Clorox utilizada para a imersão dos corpos-de-prova também foram plaqueadas. Além disso, foi avaliada a viabilidade celular de esporos mantidos em suspensão durante 5 minutos em 5 mL de Clorox ou salina. As células foram filtradas, os filtros contendo as células foram incubados em meio líquido durante 7 dias e o crescimento dos microrganismos foi avaliado. Finalmente, os autores verificaram se resíduos de Clorox presentes em corpos-de-prova previamente imersos nessa solução poderiam inibir o crescimento de microrganismos. Para isso, microrganismos foram inoculados em meio líquido contendo esses corpos-de-prova, imediatamente após a remoção dos corpos-de-prova da solução de Clorox. O

Revisão da

literatura

crescimento foi verificado pela incorporação de C^{14} nessas células nos tempos de 0, 4, 22 e 26 horas e comparado com células resuspensas em solução salina. De acordo com os resultados, os autores observaram que as próteses previamente contaminadas com os microrganismos e que foram imersas durante 5 minutos em Clorox foram esterilizadas. Alíquotas da solução de Clorox que foram expostas às próteses contaminadas também não apresentaram crescimento nas placas. Os esporos que foram ressuspensos em Clorox e coletados nos filtros não apresentaram crescimento, mesmo após 7 dias de incubação em meio líquido. Entretanto, não foi observada inibição de crescimento de suspensões de microrganismos pelo efeito residual da solução de Clorox nos corpos-de-prova. Os autores recomendaram a imersão de próteses contaminadas por procedimentos laboratoriais durante 5 minutos em solução de Clorox, seguida de enxágüe, antes da sua devolução para o paciente e antes da realização de polimento. Esse procedimento, de acordo com os autores favoreceria a proteção para o cirurgião dentista e para a equipe odontológica, bem como evitaria a contaminação da pedra-pomes e do torno de polimento.

Rohrer e Bulard⁸⁹, em 1985, realizaram um estudo para avaliar a efetividade das microondas na redução da infecção cruzada entre consultório odontológico e laboratório de prótese. Os autores realizaram os experimentos com os microrganismos inoculados em tubos de ensaio contendo meio nutriente, próteses com metal ou totalmente em resina acrílica, brocas metálicas e peças-de-mão. Os corpos-de-prova foram contaminados com 10^5 org/mL de cada um dos seguintes microrganismos: 3 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 (polio tipo 1 e herpes simplex tipo 1). Para as irradiações no forno de microondas, alguns corpos-de-prova foram e outros não foram fixados a um dispositivo rotacional tridimensional desenvolvido pelos autores. Os corpos-de-prova contaminados foram submetidos às microondas a uma potência de 720 W, nos tempos experimentais de 0, 1, 3, 5, 8 e 10 minutos, e incubados a 37°C. A

Revisão da

literatura

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. 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 4 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 somente após 15 minutos de irradiação. As brocas 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. 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 por até 16 minutos. Para a esterilização efetiva de materiais odontológicos, os autores sugeriram a irradiação por microondas associada à utilização do dispositivo tridimensional desenvolvido nesse estudo.

Em 1985, Young et al.¹¹⁰ avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de aparelhos nasais para sedação com óxido nitroso. Os autores utilizaram um forno de microondas equipado com o dispositivo rotacional tridimensional idealizado por Roher e Bulard⁸⁹. Inicialmente, os

Revisão da

literatura

aparelhos nasais foram esterilizados com óxido de etileno e contaminados com rinovírus, vírus parainfluenza tipo 3, adenovírus tipo 1 e vírus herpes simplex tipo 1 propagados em monocamadas confluentes de células. Os aparelhos foram inoculados com um número conhecido de unidades formadoras de placas (ufp) propagadoras de vírus e, a seguir, irradiados por 0, 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 minutos a 720 W. Após a irradiação, a região inoculada foi enxaguada com meio de cultura e duas amostras de 50 mL desse meio foram colocadas em monocamadas de células, as quais descansaram durante 60 minutos para permitir a adsorção dos vírus. A atividade dos vírus testados após a irradiação em microondas foi avaliada pela observação da redução do número de ufp nas monocamadas infectadas com relação ao de células não-irradiadas. 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 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 consecutivamente 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 modificado por um dispositivo rotacional tridimensional.

Roher et al.⁸⁹, em 1986, desenvolveram um método para esterilização de lentes de contato hidrofílicas. Previamente à inoculação, as lentes de contato utilizadas foram esterilizadas em autoclave. Em seguida, 10 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 compartimentos de hidratação estéreis e colocadas em embalagens autoclaváveis, que foram fixadas no dispositivo tridimensional rotatório previamente desenvolvido pelos autores Roher e Bulard⁸⁹. As



Revisão da

literatura

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 esse 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 de 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 nucleicos.

Watanabe et al.¹⁰², em 1986, avaliaram a efetividade do método do Vermelho de Pirogalol na determinação de proteínas totais em urina. De acordo com os autores, esse método se baseia na capacidade de o complexo Vermelho de Pirogalol/Molibdato de sódio ligar-se às proteínas em meio ácido, alterando seu



Revisão da

literatura

espectro de absorção de 460 nm para 600 nm. Os autores utilizaram soluções de proteínas do tipo albumina, γ -globulina humana e de Bence Jones, que tiveram suas concentrações previamente definidas pelo método do biureto. Os reagentes para o teste do Vermelho de Pirogalol foram preparados pela mistura de solução de Vermelho de Pirogalol em metanol com uma solução aquosa de molibdato de sódio contendo ácido succínico, oxalato de sódio, benzoato de sódio, e ácido clorídrico para ajuste do pH. Os autores utilizaram o método manual e o método automatizado para o preparo das misturas dos reagentes com as amostras. Para o método manual, as amostras de urina (50 μ L) ou de uma solução padrão de albumina na concentração de 1g/L foram misturadas a 3 mL do reagente de Vermelho de Pirogalol/Molibdato de sódio e permaneceram intactas por 20 minutos até a leitura de absorbância a 600 nm. Para o método automatizado, os autores diluíram as amostras 5 vezes em água para, a seguir, serem misturadas em 1,25 mL de reagente. As amostras foram transferidas para a posição de leitura de absorbância a 600 nm, após 648 segundos da mistura, com a temperatura mantida a 37°C. De acordo com os resultados, os autores puderam verificar que o pico de absorção do corante, isoladamente foi de 467 nm e do corante contendo a solução de albumina foi de 598 nm. A absorbância a 600 nm foi proporcional à concentração de albumina. Os autores avaliaram também a influência do tampão utilizado e verificaram que o tampão succinato de sódio/ácido succínico foi superior. Embora a concentração das diferentes proteínas tenha sido a mesma, a cromogenicidade das γ -globulinas foi de aproximadamente 70% da albumina. Além disso, foi encontrada correlação positiva entre as técnicas manual e automatizada de avaliação de proteínas. O método do vermelho de pirogalol-molibdato de sódio foi considerado pelos autores como adequado para uso clínico, inclusive de maneira automatizada.

Jeng et al.⁵⁶, em 1987, conduziram um estudo para investigar a possível presença de efeitos letais não-térmicos das microondas sobre os microrganismos. Os autores utilizaram suspensões de esporos de *B. subtilis* na concentração de 10^7 cél/mL em água destilada. Alíquotas de 10 μ L dessas suspensões foram

Revisão da

literatura

inoculadas na região central do fundo de frascos de borosilicato. Após a secagem dessa alíquota, os recipientes foram colocados durante uma semana no interior de uma câmara contendo um béquer com cloreto de cálcio saturado, o que forneceu umidade relativa de 33% a 22°C. Amostras paralelas dos microrganismos foram simultaneamente expostas ao calor seco em forno elétrico de propagação de calor ou em forno de microondas até as temperaturas de 107°C, 117°C, 130°C e 137°C. Uma sonda térmica fluoróptica registrou a temperatura dentro dos fornos e um dispositivo automático ajustou a temperatura do forno de propagação, de acordo com a do forno de microondas. As amostras foram resfriadas e ressuspensas em 5 mL de água destilada para posterior plaqueamento e contagem das UFC. De acordo com curvas de sobrevivência em função do tempo, os autores puderam verificar que não houve diferença significativa entre a exposição às microondas ou ao calor seco. Além disso, foi verificado que o tempo mínimo de 45 minutos de exposição a ambas as formas de aquecimento foi necessário para a inativação dos esporos. Os autores concluíram que não há efeitos não-térmicos significativos em processos de esterilização em microondas a seco e que a atividade esporificada da energia de microondas é meramente térmica.

Friedrich Jr. e Phillips⁴⁰, em 1988, avaliaram a efetividade das microondas na esterilização de tecidos de algodão contaminados com *C. albicans*. Amostras de tecidos de algodão utilizado na confecção de roupas íntimas femininas foram imersas em suspensão de *C. albicans*, depois permaneceram secando em placas de Petri por três dias em temperatura ambiente, e, a seguir, foram irradiadas por 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 minutos. As amostras foram, então, imersas em 5 mL de caldo Soy, agitadas, e, em seguida, alíquotas da solução obtida foram semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas a 35°C. Amostras não irradiadas serviram como grupo controle. Em um segundo experimento, amostras contaminadas dos tecidos foram obtidas da mesma maneira descrita anteriormente. Entretanto, essas amostras foram umedecidas em solução salina estéril imediatamente antes da irradiação. Nesse segundo experimento, em intervalos de cinco minutos, as amostras de tecido foram removidas do forno e

Revisão da

literatura

mergulhadas em caldo nutriente para que alíquotas fossem coletadas e plaqueadas. A seguir, foram incubadas a 35°C por 48 horas. Amostras umedecidas nos mesmos intervalos de tempo, porém não irradiadas, serviram como controle. 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 infecciosas recorrentes.

A efetividade da esterilização de modelos odontológicos de gesso, por meio da energia de microondas, foi avaliada por Davis et al.²⁹, em 1989. Os autores confeccionaram modelos de gesso idênticos, a partir de moldes de silicone contaminados com 0,1 mL de suspensões de bactérias esporogênicas (*B. subtilis*) ou não-esporogênicas (*S. marcescens*). Os modelos assim obtidos foram divididos em grupos que foram ou não submetidos à irradiação em microondas. Modelos de gesso obtidos a partir de moldes não contaminados foram designados como grupo controle negativo e não foram irradiados. A irradiação foi realizada após 45 minutos ou 24 horas do início da presa. Os tempos de exposição utilizados foram 1, 2 ou 20 minutos. Primeiramente, foi coletado material das regiões de 1° e 2° molares para semeadura em Agar. A seguir, os modelos foram seccionados na região localizadas entre esses dentes e foi coletado material da camada mais interior do gesso para inoculação em caldo nutritivo, seguida de semeadura em Agar. O crescimento de colônias foi avaliado como positivo ou negativo, quanto à morfologia de colônia e quanto à coloração pelo método de Gram, para ambas as bactérias inoculadas. Foi observado crescimento positivo para o *B. subtilis* em todas as amostras irradiadas, exceto no grupo controle negativo. Apesar disso, o crescimento microbiológico referente ao grupo de modelos irradiados durante 20 minutos foi visualmente menor para esse microrganismo. Para o microrganismo *S. marcescens* não foi encontrado crescimento positivo para todas as amostras, exceto para os modelos pertencentes ao grupo controle positivo, irradiados após

Revisão da

literatura

45 do início da reação de presa. De acordo com os autores, a irradiação com microondas foi efetiva na esterilização de modelos contaminados com *S. marcescens*, e não com *B. subtilis*. Segundo os autores, a falta de efetividade das microondas para a inativação do *B. subtilis* pode ser atribuída ao conteúdo insuficiente de água presente no gesso cristalizado.

Sanborn et al.⁹², 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.

Fujikawa et al.⁴¹, em 1992, estudaram a cinética de destruição de *Escherichia coli* pela irradiação de microondas. Os autores escolheram uma cepa do microrganismo que apresentava características de destruição térmica frente a

Revisão da

literatura

temperaturas constantes e a submetem a irradiações em forno de microondas doméstico convencional, com frequência de 2450 MHz, em diferentes potências. Para efeito de comparação, os autores também submetem o microrganismo a aquecimento convencional em banho-de-água. Para isso, foi obtida uma suspensão celular em tampão fosfato do microrganismo cultivado em meio líquido durante 16 a 16,6 h na concentração de 10^8 células/mL. Dessa suspensão, 45 μ L foram colocados em 4,5 mL (10^6 células/mL) de tampão fosfato previamente aquecido, em diferentes temperaturas em banho-de-água e, então, incubados por tempo determinado. A suspensão foi, a seguir, resfriada, sofreu diluições seriadas e foi semeada em agar, em duplicata. Após incubação, as UFC foram contadas e comparadas com a contagem de células submetidas às mesmas condições, porém não submetidas a aquecimento. Para o tratamento em microondas, 100 mL de uma suspensão celular (10^6 células/mL) em tampão fosfato a 20°C foram irradiados em um béquer de vidro colocado no centro do prato giratório do forno de microondas e exposto às potências de 100, 200, 300 e 500 W e diferentes períodos de tempo. Imediatamente após a exposição, alíquotas das suspensões foram retiradas e semeadas da mesma maneira como descrito para aquecimento convencional em banho-de-água, com a diferença de que o volume de líquido perdido por evaporação durante a irradiação foi repostado. Para esse procedimento e também para possibilitar a monitoração da temperatura atingida pela suspensão celular durante a irradiação, os autores mediram a massa e a temperatura, antes e após as irradiações de tampão fosfato contido em béqueres, em condições idênticas às aquelas utilizadas para o experimento. Os autores verificaram que a temperatura do tampão fosfato irradiado aumentou de forma linear ao longo do tempo (4 min) até aproximadamente 65 a 70°C. Ambas as formas de aquecimento (em banho-de-água e por microondas) inativaram os microrganismos. A inativação do microrganismo, avaliada pelo método de plaqueamento, variou em função do tempo de exposição às microondas, da potência e da constante de velocidade do aumento de temperatura do tampão. O traçado das curvas de sobrevivência dividiu-se entre três curvas lineares decrescentes de acordo com a potência e a

Revisão da

literatura

temperatura do tampão fosfato (extrapolada para a temperatura da suspensão celular). Os autores não observaram diferenças significativas entre o perfil de destruição pela irradiação de microondas e o aquecimento em banho-de-água.

Com o objetivo de diminuir os custos da utilização de catéteres descartáveis em pacientes que fazem uso de cateterização urinária intermitente, Griffith et al.⁴³, em 1993, realizaram um estudo para investigar a possibilidade da reutilização de catéteres de polietileno, após sua desinfecção por microondas. Os catéteres 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 catéteres 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 catéteres, 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 catéteres. 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 catéteres 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 catéteres foi observada pela irradiação durante 6 minutos. Além disso, os catéteres submetidos a irradiações consecutivas não demonstraram sinais exteriores de alteração estrutural. Os autores concluíram que a esterilização dos catéteres de polietileno poderia ser realizada por microondas, durante 6 minutos a 650 W.

Rosaspina et al.⁹⁰, em 1994, avaliaram o efeito da irradiação de microondas na esterilização de instrumentos 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

Revisão da

literatura

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, 3, 5, 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 controle 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 sobre os microrganismos sem provocar alterações na morfologia celular. Desintegração celular foi observada 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.

Devido à grande importância atribuída à presença de íons cálcio (Ca^{++}) na capacidade de alteração morfológica da *C. albicans* e ao fato de os vacúolos celulares atuarem como uma significativa fonte mobilizável de Ca^{++} , Calvert e Sanders¹⁸ investigaram, em 1995, os mecanismos de transporte desses íons em membranas vacuolares extraídas de células desse microrganismo. Foram obtidas

Revisão da

literatura

culturas dos microrganismos induzidos na forma de esferoblastos. As células foram centrifugadas e ressuspensas em solução tampão, e, então, lisadas. Por centrifugação e tampões específicos, os autores eliminaram debris e células não lisadas. Coletaram e purificaram os vacúolos presentes nos sobrenadantes, e, a seguir, converteram os vacúolos em vesículas. Técnicas enzimáticas foram, então, utilizadas para controlar a atividade ATPásica das membranas e mensurar o conteúdo de Ca^{++} transportado pelas membranas vacuolares pela atividade de ATPases, durante 12 minutos contados a partir do início de fornecimento de fontes de cálcio. Esse mecanismo foi ativado por InsP_3 (inositol 1,4,5-trisphosphate). O transporte de cálcio através das membranas vacuolares pelo mecanismo passivo de diferença de potencial elétrico também foi identificado e medido pelos autores. Além disso, os autores identificaram um mecanismo que permite o acúmulo de Ca^{++} dentro dos vacúolos, mecanismo esse que é ativado quando o conteúdo do íon no citoplasma aumenta, principalmente nas regiões circunvizinhas aos vacúolos celulares. Os autores identificaram a presença de dois mecanismos distintos de transporte de Ca^{++} dos vacúolos para o citoplasma, e um mecanismo de transporte desse íon do citoplasma para o vacúolo celular.

Chau et al.²³, em 1995, realizaram um estudo para avaliar a possibilidade de penetração de bactérias na resina acrílica, após curto período de exposição, e a efetividade de soluções químicas na desinfecção de resinas acrílicas para base de próteses. Corpos-de-prova de três resinas foram confeccionados e polidos apenas em uma de suas superfícies para simular as superfícies externa e interna (não polida) de uma prótese. Em seguida, foram imersos por 24 horas em 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 por 10 minutos (controle). Foi coletado material das superfícies polida e não polida para semeadura em placas de Petri. Após isso, os debris orgânicos das próteses foram removidos com gaze e as próteses, fraturadas ao meio. Foi realizada coleta de material da região correspondente à fratura, que foi



Revisão da

literatura

semeado em placas de Agar para verificação de contaminação nas camadas mais profundas da resina. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e o número de ufc, quantificado. Os autores observaram crescimento nas placas correspondentes ao material coletado nas camadas internas da prótese e que os corpos-de-prova que foram 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 somente o tratamento com hipoclorito de sódio foi eficiente para inativar esses microrganismos.

Hawser e Douglas⁴⁵, em 1995, desenvolveram uma técnica para a avaliação do desenvolvimento de biofilmes de *Candida*. Os microrganismos foram cultivados em discos de 0,5 cm² de materiais utilizados na confecção de catéteres. A formação dos biofilmes foi determinada quantitativamente, por meio de análise colorimétrica utilizando a redução de sal tetrazolium e a análise de incorporação de 3H-leucina e os resultados de ambos os métodos foram comparados com o método de determinação do peso seco. Os resultados demonstraram que houve correlação entre os resultados dos três métodos avaliados. O crescimento de biofilmes de *C. albicans* em meio contendo 500 mM de galactose ou 50 mM de glicose atingiu crescimento máximo após 48 horas, quando, então, diminuiu. O crescimento celular foi menor em meio contendo baixo conteúdo de glicose. A comparação da formação de biofilmes entre 15 diferentes isolados de *C. albicans* não demonstrou correlação com a patogenicidade dentro desse grupo. Houve correlação entre a formação de biofilme e a patogenicidade dos microrganismos quando diferentes espécies de *Candida* foram comparadas. Isolados de *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, e *C. glabrata* apresentaram significativamente menor crescimento de biofilme do que a *C. albicans*. A avaliação de vários materiais utilizados na confecção de catéteres demonstrou que a formação de biofilme pela *C. albicans* foi maior sobre o látex

Revisão da

literatura

ou silicone do que sobre o cloreto de polivinil. A menor formação de biofilme foi encontrada sobre os materiais poliuretano ou 100% silicone. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que, após 48 horas, os biofilmes de *C. albicans* consistiram de uma densa estrutura de leveduras, tubos germinativos, pseudohifas e hifas verdadeiras. Além disso, foram encontradas algumas quantidades de matriz polimérica extracelular na superfície de algumas dessas formas morfológicas. De acordo com os autores, o modelo de avaliação de biofilmes proposto por eles poderia ser uma alternativa simples e conveniente para o estudo da susceptibilidade de biofilmes celulares a antifúngicos.

Mathaba et al.⁷⁰, em 1995 avaliaram a relação genética entre cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes com estomatite protética. Os microrganismos foram obtidos de diferentes localizações da cavidade oral de 18 pacientes, totalizando 25 isolados. Como critério de exclusão, foram considerados os pacientes com AIDS ou doenças malignas. Foi verificado que 11 dos pacientes apresentaram candidose oral associada ao uso de próteses. As relações genéticas dos isolados individuais foram determinadas pela hibridização de uma sequência moderadamente repetitiva *C. albicans*-específica, 27A, com o DNA cromossomal de *C. albicans* EcoRI-digerido. A partir dos perfis de DNA, os isolados puderam ser divididos em 22 grupos genéticos. Na maioria dos pacientes, uma única cepa de *C. albicans* foi dominante na cavidade oral. A nova infecção da mucosa após a terapia antifúngica foi geralmente atribuída à infecção por cepas originais que causaram a infecção. As cepas de *C. albicans* isoladas das próteses não constituíram um grupo genético distinto. De acordo com os autores, a estomatite protética é causada pela reativação de cepas comensais de *C. albicans*.

A interação da energia eletromagnética com os materiais biológicos foi avaliada por Ponne e Bartels⁸⁶, em 1995, com ênfase especial para o processamento de alimentos. Segundo os autores, o modo como a energia eletromagnética interage com um corpo depende principalmente da distribuição dos campos eletromagnéticos dentro do material e que o perfil de aquecimento de um material será determinado pela resistência desse campo no sítio de interação.



Revisão da

literatura

Foi afirmado também que o aquecimento promovido pelos campos eletromagnéticos ocorreria por meio de dois mecanismos: migração de íons e rotação de moléculas dipolares. Dessa forma, a determinação das propriedades dielétricas de um material pode oferecer muito na determinação de sua habilidade em interagir com um campo elétrico alternado. Além disso, os autores afirmaram que o comportamento dielétrico de um material biológico pode ser influenciado por três diferentes mecanismos, de níveis distintos: o primeiro é a interação com a matriz aquosa coloidal ou sais, metabólitos, enzimas, açúcares, ácidos nucleicos e organelas e, ainda, materiais de reserva, tais como amido e glicogênio; o segundo nível corresponde à região próxima às membranas e paredes celulares, as quais são carregadas por ionização de superfície e circundadas por uma camada de íons pareados; o terceiro nível de interação é com a matriz aquosa externa que contém sais, nutrientes e resíduos. Os autores afirmaram que a quantidade de energia que um material absorve pela irradiação de microondas é insuficiente para quebrar ligações químicas. Entretanto, existem estruturas nos materiais biológicos, tais como as estruturas com pontes de hidrogênio, que podem ser afetadas por quantidades muito baixas de energia. Além disso, as moléculas passíveis de ligação com a água (“hidration”), tais como as proteínas, poderiam, nesse caso, sofrer a absorção das microondas pelo efeito direto do campo eletromagnético, provocando o relaxamento rotacional de dipolos presentes nas suas moléculas ou pela absorção de energia térmica rotacional, devido às colisões de moléculas de água vizinhas. Com relação aos efeitos nos microrganismos e membranas biológicas, os autores sugeriram a hipótese de ocorrência de alteração da concentração iônica, ao longo das membranas, ou reorientação das moléculas de cadeias longas. As paredes celulares bacterianas também foram sugeridas como sendo alteradas pelas microondas, bem como as membranas celulares, haja vista que foi observado, em trabalhos citados pelos autores, que houve a liberação de substâncias de dentro de vesículas fosfolipídicas irradiadas, mesmo em temperaturas abaixo da temperatura de transição vítrea de membranas. Os autores afirmaram, ainda, que a interação direta da energia eletromagnética e um material,

Revisão da

literatura

em instâncias moleculares e celulares, é pouco conhecida, e é de especial interesse examinar como a energia eletromagnética pode influenciar a atividade enzimática e outras moléculas dos microrganismos.

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 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. O valor de ufc/mL foi, então, determinado. A temperatura da suspensão bacteriana foi determinada por meio de um termômetro digital antes e após a irradiação. 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 estatisticamente significativa em relação ao controle. A diminuição na contagem de bactérias expostas ao calor convencional foi significativa em relação às amostras irradiadas por microondas. Porém, contrariamente ao observado com as amostras irradiadas, a aplicação de calor convencional por 30 segundos resultou em sobrevivência bacteriana, de modo que tempos adicionais de 1 e 2 minutos de aplicação de calor convencional também foram avaliados. O aumento do volume das suspensões exacerbou o efeito destrutivo das microondas, uma vez que, após a irradiação, a contagem das ufc/mL 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

Revisão da

literatura

conteúdo de líquido no meio desempenha uma função importante na absorção da energia criada pela irradiação por microondas.

Em 1996, Cole e Robison²⁴ relataram que, para selecionar os microrganismos adequados a uma avaliação de efetividade de tratamento químicos, é importante considerar os mecanismos de resistência germicida, bem como os conceitos de microrganismos patogênicos hospedeiros 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 *S. aureus*, e gram-negativas, como *P. aeruginosa*, foi recomendada. Esses 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 *C. albicans* foi considerada o fungo mais resistente, e, por isso, deveria ser utilizada em pesquisas de desinfecção. Entre 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.

De acordo com Pelczar et al.⁸², em 1996, a membrana citoplasmática dos fungos tem aproximadamente 7,5 nm de espessura, e é composta primariamente de fosfolipídeos (20 a 30%) e proteínas (50 a 70%). Os fosfolipídeos formam uma bicamada na qual a maioria das proteínas está embebida. Cada molécula de fosfolipídeos contém uma cabeça polar, com carga elétrica (a terminação fosfato) e uma cauda apolar, sem carga elétrica (a terminação hidrocarbônica). Na bicamada fosfolipídica, as terminações apolares, insolúveis em água, estão do lado de dentro. Os fosfolipídeos tornam a membrana fluida, permitindo que os componentes protéicos se movimentem, sendo esta fluidez essencial para várias



Revisão da

literatura

funções da membrana. Tal arranjo de fosfolipídeos e proteínas é chamado de modelo do mosaico fluido. Alguns processos essenciais para a célula estão localizados na membrana citoplasmática. Ela é uma barreira para a maior parte das moléculas solúveis em água e é muito mais seletiva que a parede celular. Entretanto, proteínas específicas na membrana chamadas permeases transportam pequenas moléculas para dentro da célula. A membrana também contém várias enzimas, algumas envolvidas na produção de energia e síntese da parede celular. Quando a concentração de uma substância dissolvida (soluto) em água é maior de um lado da membrana biológica, tal como uma membrana citoplasmática, existe um gradiente de concentração. Isto significa que há uma diferença gradual na concentração do soluto em diferentes localizações. Se o soluto atravessar a membrana seletivamente permeável, ele se moverá para o lado mais diluído. O equilíbrio é atingido quando a taxa de movimento de um lado para o outro é igual. Esse movimento de solutos através da membrana semipermeável (seletivamente permeável) é referido como uma difusão simples, que é um processo passivo, uma vez que a célula não gasta energia para realizá-lo. As células dependem da difusão simples para transportar algumas moléculas pequenas tais como oxigênio e dióxido de carbono, dissolvidos por meio de suas membranas citoplasmáticas. Esse processo de transporte frequentemente não requer gasto de energia pela célula. Moléculas solventes, tais como água, também atravessam livremente a membrana semipermeável, fluindo de uma região na qual as moléculas estão altamente concentradas para uma de baixa concentração. Em outras palavras, o solvente passa de uma solução de baixa concentração de soluto (alta concentração de água) para uma de alta concentração de soluto (baixa concentração de água).

Alberts et al.², em 1997, descreveram a membrana citoplasmática como sendo composta basicamente de fosfolipídeos dispostos em uma bicamada e proteínas embebidas. Cada molécula de fosfolipídeo contém uma extremidade polar (a terminação fosfato) e uma extremidade apolar (a terminação hidrocarbônica). Na bicamada fosfolipídica, as terminações apolares, insolúveis em água, estão do lado de dentro e os fosfolipídeos tornam a membrana fluida,

Revisão da

literatura

permitindo que os componentes protéicos se movimentem. Além disso, os autores afirmaram que os íons K^+ apresentam funções específicas nas células, entre as quais, a função bioquímica de cofator enzimático, e, em condições normais, respondem por 40% da osmose citoplasmática, bem como controlam a resistência iônica do citoplasma.

A efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de um material reembasador resiliente contaminado com microrganismos patogênicos foi avaliada por Baysan et al.⁸, 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 (*C. albicans* ou *S. aureus*) e incubados aerobicamente a 37°C. Após três dias de incubação, o meio de cultura foi descartado e os corpos-de-prova enxaguados cuidadosamente em 10 mL de salina fosfatada tamponada (PBS) para remoção de células não aderidas. 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 foram 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 PBS por 5 horas em temperatura ambiente. A seguir, os corpos-de-prova foram individualmente colocados em tubos com 10 mL de PSB e agitados por 15 minutos. As 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



Revisão da

literatura

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.

Em 1998, Chaffin et al.²⁰ relataram em um artigo de revisão a composição da parede celular de *C. albicans*. De acordo com os autores, aproximadamente de 80 a 90% da parede celular de *C. albicans* é constituída por carboidratos. Os três constituintes básicos que representam os principais polissacarídeos da parede celular são: polímeros ramificados de glicose com ligações β -1,3 e β -1,6 (β -glucanas), polímeros não ramificados de *N*-acetil-D-glicosamina com ligações β -1,4 (quitina) e polímeros de manose (mananas) covalentemente associados com proteínas (glico[mano]proteínas). Adicionalmente, a parede celular contém proteínas (6 a 25%) e menor quantidade de lipídios (1 a 7%). Os polímeros microfibrilares (β -glucanas e quitina) representam os componentes estruturais da parede, que formam um esqueleto rígido, proporcionando fortes propriedades físicas à célula. Quantitativamente, β -glucanas são os principais constituintes, variando de 47 a 60% do peso da parede celular. A quitina, apesar de representar uma pequena quantidade (0,6 a 9%), é um importante componente da parede de *C. albicans*, particularmente na região do septo entre compartimentos celulares independentes. As mananas representam 40% do total de polissacarídeos da parede celular, sendo o principal constituinte da matriz de parede. A composição de parede entre leveduras e hifas é similar, apesar da quantidade relativa de β -glucanas, quitina e mananas variar de acordo com a forma de crescimento de *C. albicans*. Hifas apresentam, pelo menos, três vezes mais quitina do que leveduras. Apesar da proporção de β -1,3- e β -1,6-glucana na fração insolúvel ser similar em leveduras e hifas, o glucana insolúvel durante período de formação do tubo germinativo contém consideravelmente mais ligações β -1,3 do que o encontrado em leveduras e hifas maduras.

Revisão da

literatura

Pakhomov et al.⁸¹, em 1998, em seu trabalho de revisão de literatura, fizeram um levantamento dos trabalhos que avaliaram os efeitos biológicos das microondas. Os autores verificaram que, em alguns casos, as microondas provocam o aumento e em outros a diminuição na velocidade de crescimento de microrganismos e outras células, haplóides ou diplóides, inclusive a *C. albicans*. O efeito nesse microrganismo, especificamente, foi relacionado com a modulação ou não da irradiação: a irradiação de ondas contínuas aumentou a velocidade de crescimento em 25% e a irradiação de ondas moduladas a 1 kHz reduziu essa velocidade em aproximadamente 15%. Outros trabalhos citados pelos autores encontraram alterações na conformação de DNA e nas ligações DNA-proteínas de *E. coli*, quando se atingiram frequências ressonantes, e as alterações foram proporcionais ao aumento da potência (intensidade de campo) da irradiação. Também foram descritos pelos autores, estudos relacionados às alterações no bombeamento de cálcio para fora e para dentro de células biológicas e os resultados foram dependentes do tempo de exposição, da modulação ou não da energia, e do tipo de célula (modelo biológico) utilizada. Com relação a experimentos realizados com membranas biológicas artificiais, os estudos encontrados pelos autores não evidenciaram efeitos relacionados à frequência, mas a alteração do transporte de íons, nessas estruturas foi afetada pelas irradiações de maneira semelhante ao aquecimento convencional. Entretanto, as membranas de células musculares e cardíacas tiveram seu potencial transmembranoso afetado para mais ou para menos em diferentes frequências, potências e tempos de exposição. Os autores afirmaram que a maioria dos trabalhos por eles avaliados encontrou efeitos não-térmicos associados às microondas.

Radford et al.⁸⁷, em 1998, compararam a capacidade de aderência da *C. albicans* (com e sem transformações fenotípicas) às superfícies de uma resina acrílica termopolimerizável (Trevalon) e dois materiais reembasadores (Molloplast B e Novus), com graus diferentes de rugosidade superficial. Para cada material, foram confeccionados 30 corpos-de-prova, unidos dois a dois para permitir, não



Revisão da

literatura

somente a padronização da obtenção, mas também dos tratamentos dados aos corpos-de-prova. Metade de cada uma das hemifaces dos corpos-de-prova foi polimerizada em contato com uma lâmina de vidro e não recebeu acabamento (superfície lisa - controle) e a outra metade foi submetida a acabamento (superfície rugosa). O acabamento da resina de base foi realizado com fresa de aço e o dos materiais reembasadores, com lixas de carvão de silício. As colônias com e sem transformação fenotípica foram obtidas a partir de cepas 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 contendo os pares de corpos-de-prova unidos. Após a remoção das placas, os corpos-de-prova foram enxaguados, secos, montados em lâminas de vidro e corados. As leveduras e hifas aderidas foram contadas microscopicamente pela técnica de amostra estratificada. Os resultados para a aderência de leveduras demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na aderência dos dois tipos de *C. albicans* (com ou sem transformação fenotípica). Foi observada menor aderência desses microrganismos à resina acrílica do que aos materiais reembasadores e a aderência às superfícies lisas foi menor do que às superfícies rugosas. A aderência à resina acrílica de base foi menor do que aos materiais reembasadores. O número de leveduras aderidas aos materiais foi superior ao número de hifas, tendo sido a contagem dessas últimas, realizada em maior aumento do microscópio. Para as hifas, foi observada maior aderência de *C. albicans* com transformação fenotípica, mas não houve diferença significativa de aderência entre os materiais. Os autores concluíram que a rugosidade de superfície promoveu a adesão e que a capacidade de transformação fenotípica dos microrganismos não influenciou na aderência das leveduras mas, sim, na aderência de hifas.

Tajchakavit et al.⁹⁷, em 1998, investigaram a cinética de inativação de microrganismos degradadores de alimentos em microondas. Os autores compararam o aquecimento em microondas com o aquecimento térmico quanto ao



Revisão da

literatura

tempo de aquecimento/resfriamento e diminuição das ufc em meio sólido. Dois microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum*), obtidos a partir da ativação de cepas padrão liofilizadas, foram inoculados na concentração de 10^5 a 10^6 ufc, em suco de maçã pasteurizado. Alíquotas de dois mL dessas culturas foram colocadas em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e submetidas ao aquecimento térmico em banho-de-água de 50 a 80°C, durante 10 segundos a 70 minutos. A seguir, foram imediatamente resfriadas em banho-de-gelo e semeadas em agar para contagem das ufc, em duplicata. Os microrganismos obtidos da mesma forma que para o banho-de-água foram aquecidos em microondas a 700 W e 2450 MHz até a temperatura final de 52,5 a 65°C. O tratamento em microondas foi realizado de maneira que as culturas em suco de maçã passassem em fluxo contínuo dentro de uma mola helicoidal de vidro enquanto foram submetidas à irradiação. A temperatura do líquido foi monitorada e controlada na entrada e na saída do forno. As alíquotas irradiadas (10 mL) foram coletadas assepticamente, resfriadas imediatamente em banho-de-gelo e plaqueadas para contagem das ufc. Os autores obtiveram os perfis de variação de tempo-temperatura, para ambos os tipos de tratamento, durante o aumento da temperatura e o resfriamento das amostras dos microrganismos estudados. A irradiação de microondas demonstrou ser mais rápida na redução decimal (D), que é a inativação de 90% dos microrganismos presentes, do que o aquecimento em banho-de-água. A proporção entre a inativação por irradiação e a inativação por banho-de-água foi da ordem de 19 vezes para *S. cerevisiae* e 43 vezes para *L. plantarum*. De acordo com os autores, nas condições experimentais utilizadas, o aquecimento em microondas foi mais rápido do que o térmico convencional na destruição de microrganismos, o que sugeriria a presença de efeitos térmicos adicionais associados à utilização de microondas.

Verschaeve e Maes¹⁰¹, em 1998, realizaram uma revisão de literatura sobre os efeitos genéticos, carcinogênicos e teratogênicos dos campos de radiofrequência (em que estão inseridas as microondas). Os autores revisaram trabalhos que investigaram as frequências dos fornos de microondas (2450 MHz),

Revisão da

literatura

embora tenham dado ênfase às frequências específicas para utilização em telefonia móvel. De acordo com os autores, as microondas estão localizadas entre as radiações eletromagnéticas não-ionizantes e, portanto, são incapazes provocar a ionização de moléculas ou de quebrar ligações químicas. Os autores descreveram que a dose de radiação a que os corpos, tecidos ou células estão expostos é expressa pela sua razão específica de absorção, em energia por unidade de tempo e massa. Entretanto, a dosimetria permanece uma tarefa muito difícil devido às diferentes propriedades elétricas dos diversos materiais. Com relação aos efeitos das irradiações de radiofrequência sobre o DNA, os autores afirmaram que somente encontraram evidências de dano aos sistemas biológicos, após exposições agudas ou crônicas, em dois trabalhos que encontraram alteração no comprimento de seqüência e na separação das fitas das moléculas de DNA, respectivamente. Com base na maioria dos trabalhos revisados, os autores verificaram que, em condições de exposições não-térmicas, os campos de radiofrequência não induziram efeitos genéticos, teratogênicos ou cancerígenos.

Border e Rice-Spearman¹¹, em 1999, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de materiais laboratoriais (meios de cultura, gases e chumaços de algodão). 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 TSB e incubados a 37°C por 24 horas. A seguir, 25 mL de cada solução foram irradiados a 650 W por 5 segundos. Esse procedimento foi repetido e, após 15 segundos de intervalo, uma nova irradiação de 90 segundos foi realizada. Os meios de cultura irradiados foram semeados em placas de Petri e incubados por 24 horas a 37°C. Chumaços de algodão estéreis e gases foram imersos separadamente no meio de cultura TSB inoculado, irradiados por 15 segundos a 650 W e novamente irradiados por 90 segundos, após 15 segundos de intervalo. Após as irradiações, os gases e os chumaços foram semeados por esfregaço em placas de Petri que foram incubadas a 37°C por 24 horas. As ufc foram quantificadas. Além disso, um frasco contendo TSB não inoculado foi irradiado em intervalos de um minuto até um total de 5 minutos de

Revisão da

literatura

irradiação e semeadura 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 inativação 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.³⁴ avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de resinas acrílicas de base e reembasamento de próteses 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 2 reembasadores resilientes (Molloplast-B e Permaflex) e 1 resina termopolimerizável (Lucitone 199). Os corpos-de-prova foram submetidos aos ensaios de dureza Shore A, e, então, inoculados com *C. albicans* em meio líquido. Após 48 horas de incubação, 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 em longo prazo (duas semanas) foi observada pela análise de crescimento visível em meio de tioglicolato contendo os corpos-de-prova irradiados. 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 (Molloplast-B, Permasoft e Lucitone 199) foram irradiados a seco pelos tempos de exposição de 10 ou 15 minutos e submetidos aos ensaios de dureza. 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 acumulativo da irradiação sobre a dureza, os corpos-de-prova foram irradiados por mais 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, esterilização efetiva foi observada após a irradiação em microondas por 5 minutos quando os corpos-de-prova foram imersos em água. Os

Revisão da

literatura

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 apresentaram 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 corpos-de-prova dos 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 Rossen⁵³, 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 (tratamento físico). Os autores enfatizaram que as esponjas foram umedecidas antes da irradiação para maior efetividade do método e também para prevenir que essas, em estado seco, entrassem em combustão. Após cada tratamento, 1 mL da solução remanescente das esponjas foi inoculado em tubos de

Revisão da

literatura

ensaio contendo TSB, 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 onde a utilização doméstica foi simulada, mas esses produtos não reduziram de forma significativa as bactérias presentes nas esponjas onde 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 em alta potência por um minuto reduziram a viabilidade dos microrganismos em 99,9 %.

Lin et al.⁶², 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 expostos às suspensões microbianas e esterilizados em óxido de etileno e 4 utilizados como controle negativo, não expostos às suspensões microbianas, e esterilizados por autoclave. Os 88 corpos-de-prova foram colocados em Erlenmeyer contendo 400 mL de TSB com os microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *C.albicans* em concentração inicial de 10⁷ org/mL. 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). 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

Revisão da

literatura

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 5g/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 número de ufc de *E. coli* foi maior que de *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.

McDonnell e Russell⁶⁴, em 1999, revisaram os mecanismos de ação dos desinfetantes e antissépticos mais comuns, bem como os mecanismos de resistência dos microrganismos a essas substâncias. De acordo com os autores, existe uma variedade de técnicas para se estudar o mecanismo de ação dos antissépticos e desinfetantes, entre elas lise e liberação de material intracelular, dano à homeostase celular, efeitos sobre modelos de membranas, inibição de

Revisão da

literatura

enzimas, transporte eletrônico, fosforilação oxidativa, interação com macromoléculas, efeito na síntese de macromoléculas celulares e exame microscópico das células expostas a essas substâncias. Afirmaram também que estudos específicos para fungos podem incluir o exame da porosidade da parede. O mecanismo de ação dos álcoois baseia-se na inibição da esporulação e germinação de uma grande variedade de microrganismos. O glutaraldeído, utilizado como desinfetante e esterilizante, tem sua ação biocida fortemente relacionada com as camadas externas das células, tendo as aminas com baixo teor de hidrogênio como prováveis sítios reativos, no caso das bactérias, e a quitina, principal componente da parede celular, no caso dos fungos. O formaldeído é uma substância química extremamente reativa que interage com proteínas, DNA e RNA *in vitro* e tem propriedades de interação com proteínas e de formação de ligações cruzadas com cadeias de DNA. Outros biocidas foram citados como os agentes liberadores de formaldeído e o *o*-ftalaldeído. Entre a classe dos biguanidos, os autores sugeriram a clorexidina como tendo amplo espectro de ação, substantividade e baixa irritação, condições adequadas para ser utilizada como antisséptico. Foi sugerido que o seu mecanismo de ação é bifásico: está associado à liberação de componentes intracelulares em concentrações menores e ao congelamento do citosol, com conseqüente interrupção dessa liberação. Foram citados os agentes liberadores de halogênios (cloro e iodo) como compostos que penetram rapidamente as células e atacam grupos importantes de proteínas, nucleotídeos e ácidos graxos e os compostos de prata, que se ligam aos grupos –SH. Os peróxidos, de acordo com os autores, agem como oxidantes pela produção de radicais hidroxilas livres que atacam lipídeos, proteínas e DNA e pelo rompimento de pontes sulfidrilas e dissulfeto. Os fenóis foram citados pelos autores como indutores da liberação de K^+ , o que é um sinal de dano à membrana citoplasmática, embora tenha sido relatado também que essa substância tenha influenciado no processo de separação de duas células bacterianas filhas. Os autores afirmaram que os compostos fenólicos triclosan e cloroxilenol agem alterando a permeabilidade da membrana externa, e o hexaclorofeno, inibindo a



Revisão da

literatura

cadeia de transporte de elétrons na região de membrana. Os compostos quaternários de amônia foram citados como desorganizadores da estrutura e da integridade da membrana citoplasmática e com outros danos celulares conseqüentes dessas alterações. Os autores citaram, ainda, os gases esterilizantes, tais como óxido de etileno, formaldeído, peróxido de hidrogênio e ácido peracético.

O mecanismo de transferência transitória de calor de uma suspensão de *S. aureus* após a irradiação em microondas foi avaliado por Yeo et al.¹⁰⁹, 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. Alíquotas de 15 µL dessas suspensões foram pipetadas sobre as superfícies de discos estéreis de aço inoxidável (15 x 5 mm). Adesivos indicadores de temperatura foram aplicados nesses 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 o microrganismo 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 seu 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



Revisão da

literatura

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.

Bohr e Bohr, em 2000¹⁰, investigaram a possibilidade de a irradiação com microondas afetar a cinética de dobramento da proteína globular β -lactoglobulina. Os autores utilizaram suspensões dessa proteína em uréia, em pH ácido. Essa solução permite a obtenção de proteínas em três estados: fase de denaturação fria, estado de dobramento e a fase de denaturação por calor. A solução foi submetida a irradiações a 365 nm dentro de tubos que permitiram o fluxo da solução no seu interior. Os autores observaram que, em baixas temperaturas, é realizado o dobramento a partir da fase de denaturação fria, enquanto que em altas temperaturas, a denaturação da proteína é obtida a partir da sua fase dobrada. Nesse último caso, um gradiente de temperatura negativo é necessário para o processo de denaturação, sugerindo que os efeitos das microondas são não-térmicos. Considerando essas informações os autores sugeriram que podem existir oscilações topológicas específicas nas proteínas para as microondas. De acordo com os autores, as microondas são uma tecnologia promissora em aplicações biotecnológicas como síntese protéica e agregação de proteínas e pode ter implicações para sistemas biológicos.

O efeito da irradiação com microondas em suspensões celulares de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* foram estudados por Watanabe et al.¹⁰³, em 2000. As células microbianas foram obtidas de culturas em meios líquidos e ressuspensas na concentração de 2×10^7 ufc/mL em PBS contendo sulfato de magnésio. À solução tampão foram adicionadas diferentes concentrações de NaCl, KCl e sacarose. Alíquotas de 3 mL das suspensões dos microrganismos foram colocadas em tubos de ensaio que, por sua vez foram colocados dentro de frascos erlenmeyers. Dentro dos frascos foi colocado o volume de 90 mL de água a 30°C, solução salina ou líquido nenhum. Os autores irradiaram o tubo de ensaio dentro dos frascos por vários períodos de tempo a 500 W e 2450 MHz de frequência e

Revisão da

literatura

semearam 100 µL de cada suspensão irradiada em meio de cultura sólido para contagem das ufc. Alíquotas de suspensões não irradiadas serviram como grupo controle. Os autores também testaram a variação de temperatura de alíquotas de duas diferentes composições de líquidos (água ou solução salina) dentro dos tubos de ensaio sem microrganismos, variando o seu volume de 2 a 9 mL. A temperatura das suspensões celulares, do líquido dos tubos e do líquido contido nos frascos foi monitorada com o auxílio de um termômetro fluoróptico. Os resultados demonstraram que após 30 segundos de irradiação, a temperatura das suspensões de microrganismos aumentou de 30°C para 100°C ou de 0,5°C para 28°C. A inativação celular de 99,9% foi atingida com 50 segundos de irradiações para todos os microrganismos. Para as suspensões de *E. coli*, a irradiação durante 30 segundos não promoveu inativação quando sua temperatura inicial foi de 0,5°C. O aumento na velocidade de inativação celular foi proporcional ao aumento da concentração iônica das soluções de NaCl e KCl, mas não da solução de sacarose. Com relação à variação da temperatura dos líquidos contidos nos tubos de ensaio em função da sua própria e da composição do conteúdo do frasco, os autores verificaram que o maior aumento da temperatura ocorreu nos líquidos dos tubos inseridos em frascos vazios, devido à absorção de energia por um menor volume de material dentro do forno. Quando o frasco foi preenchido com solução salina, a velocidade do aumento da temperatura dessa solução foi maior do que o do conteúdo do tubo, tanto para a água quanto para a solução salina. Quando o conteúdo do frasco foi a água, a velocidade de aumento de temperatura do conteúdo do tubo foi maior para a água do que para a solução salina. Após 20 segundos de irradiação, as alíquotas de 2 mL dos frascos atingiram uma temperatura superior à da alíquota de 9 mL dos erlenmeyers. Os autores concluíram que a inativação microbiana por irradiação de microondas ocorre primariamente por efeitos térmicos e que o aumento na concentração iônica dos líquidos irradiados promoveu um aumento tanto na temperatura quanto na inativação celular. Concluíram, ainda, que o aquecimento de líquidos por meio



Revisão da

literatura

das microondas é dependente da forma do recipiente, sendo mais rápido quanto maior for a área de superfície exposta às microondas.

O efeito das microondas sobre *E. coli* e de *B. subtilis* foi estudado por Woo et al.¹⁰⁸, em 2000. Foram utilizadas culturas padrão dos microrganismos em suspensão salina na concentração de 10^9 a 10^{10} ufc/mL irradiadas a 2450 MHz, 600 W e durante 0 (grupo controle) a 80 segundos. A variação de temperatura das suspensões foi monitorada e após as exposições, os autores utilizaram diluições seriadas em solução salina das mesmas e realizaram análises dessas amostras para quantificação de células viáveis, ácidos nucleicos e proteínas. Realizaram contagem das ufc/mL em meio sólido e compararam os resultados obtidos com a densidade celular, em espectrofotômetro a 600 nm. A quantidade de proteína liberada pelas células lisadas foi medida a 595 nm, pelo método de Bradford, e o conteúdo de ácido nucleico do sobrenadante foi medido diretamente a 260 nm, em espectrofotômetro de UV. Os procedimentos foram realizados em triplicata. Foi observada uma diminuição severa na contagem do número de células viáveis proporcionalmente ao aumento da temperatura provocado pelas microondas e a maior redução ocorreu entre 50°C e 60°C. A densidade celular para os dois microrganismos não diminuiu, apesar da diminuição na contagem do número de células viáveis. A quantidade de ácido nucleico e de proteínas liberada pelas células aumentou com o aumento da temperatura provocado pelas microondas. Entretanto, *B. subtilis* liberou uma quantidade maior de ácido nucleico e *E. coli* liberou uma quantidade maior de proteína. A superfície das células irradiadas demonstrou uma maior alteração para *E. coli* do que para *B. subtilis*, em microscopia eletrônica de varredura. Os microrganismos irradiados e não irradiados foram expostos a um detergente (dodecil sulfato de sódio) e sua densidade celular foi medida. Para *E.coli*, o detergente foi efetivo na redução da densidade celular apenas após a irradiação e para *B. subtilis* não houve redução em nenhuma das condições. Foi verificado ainda, por microscopia eletrônica de transmissão, que as células irradiadas apresentaram manchas escuras no citoplasma, que foram atribuídas a aglomerados de proteínas. Os autores

Revisão da

literatura

associaram esta aglomeração protéica a um dos mecanismos de inativação microbiana pelas microondas, causada pelo aquecimento. De acordo com os autores a exposição às microondas pode ter causado inativação sem que ocorresse a lise total das células e que não está elucidado o mecanismo de indução de choque térmico de proteínas em células microbianas, pelas microondas.

Banting e Hill⁶, 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 clorexidina a 0,2% (controle). Todos os pacientes receberam medicação antifúngica tópica (Nistatina 300000 IU três 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 momentos: 1º, 5º e 10º dias. 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 (1º, 5º e 10º dias), estabelecendo parâmetro para comparação entre os grupos. Os resultados demonstraram que, após 14 dias, 53% das próteses submetidas ao tratamento com microondas apresentaram pseudohifas de *C. albicans* e que essa porcentagem foi de 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 dos 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 a adequada desinfecção nas próteses sem ocasionar efeitos deletérios aparentes aos seus materiais constituintes.

Revisão da

literatura

Barbosa et al.⁷, em 2000, avaliaram a alteração da dimensão vertical de oclusão em próteses totais confeccionadas com resinas acrílicas polimerizadas por microondas, comparando-as com a técnica de polimerização em banho-de-água. Os autores obtiveram o enceramento das bases das próteses totais padronizadas por meio de matrizes de silicone RTV. A seguir, incluíram as bases enceradas em muflas odontológicas convencionais metálicas, ou em muflas especiais para a utilização em fornos de microondas, e polimerizaram as próteses. Para a polimerização em microondas, foram utilizados três ciclos de polimerização, variando-se o tempo e a potência de irradiação, e, para a polimerização convencional, foi utilizado um ciclo longo de polimerização, a 74°C durante 9 horas. Os autores observaram que, para todos os grupos, ocorreu um afastamento inferior a 0,5 mm, entre o pino e a mesa incisais, não existindo diferença estatisticamente significativa entre as duas técnicas de polimerização.

Em um trabalho de revisão de literatura, Calderone e Fonzi¹⁷, em 2001, descreveram os fatores de virulência da *C. albicans*. De acordo com os autores, a candidíase é uma infecção comum da pele, cavidade oral e esôfago, trato gastrointestinal, vagina e sistema vascular em humanos. Embora a maioria das infecções ocorra em pacientes imunocomprometidos ou debilitados, a *C. albicans* expressa diversos fatores de virulência que contribuem para a patogênese. Esses fatores incluem a presença de biomoléculas de reconhecimento do hospedeiro (adesinas) e a produção de fosfolipases e proteases aspartil secretadas. Os autores descreveram os eventos iniciais da patogenia da candidose, que se inicia pelo reconhecimento do hospedeiro. A ligação do microrganismo a proteínas ou competidores do microrganismo pode dificultar a sua identificação por parte do hospedeiro. Além disso, embora seja bem difundida a idéia de que a invasão tecidual seja facilitada pela transformação do microrganismo para a forma de hifas, de acordo com os autores, outros mecanismos de penetração tecidual podem ocorrer. Os autores descreveram a invasão tecidual das leveduras por um processo que foi denominado “*persoption*”, e, também, por meio de fagocitose por parte das células humanas da região da faringe e do esôfago. Além disso, alterações

Revisão da

literatura

fenotípicas são acompanhadas de alterações na expressão antigênica, morfologia de colônia e afinidade aos tecidos da *C. albicans* e outras espécies de *Candida*. As alterações podem proporcionar às células, flexibilidade, favorecendo a sua adaptação às condições do próprio hospedeiro e do tratamento imposto por algum tipo de terapia.

Chandra et al.²², em 2001, verificaram a formação de biofilmes de *C. albicans* e de *S. cerevisiae* sobre corpos-de-prova de metilmetacrilato e de silicone. Foram utilizadas cepas padrão e isoladas da cavidade bucal de pacientes, as quais foram inoculadas em corpos-de-prova de 1,5 cm², para o metilmetacrilato, e de 1,5 cm de diâmetro, para o silicone. Foram utilizadas técnicas para verificação do número de células pela redução de tetrazolium e pelo peso seco dos materiais. Além disso, foram avaliadas quanto à atividade metabólica, por meio de corantes fluorescentes e microscopia confocal a laser. Os autores também avaliaram a susceptibilidade dos microrganismos a diferentes concentrações (0,5 a 256 mg/mL) de fluconazole, amfotericina B, nistatina, ou clorexidina. Os autores observaram que as leveduras aderidas são transformadas em comunidades celulares bem definidas, inseridas em uma matriz de polissacarídeos. Os biofilmes constituíram um nicho de proteção contra a terapia com antibióticos, podendo criar uma fonte para infecções refratárias. Além disso, a observação de biofilmes por microscopia de fluorescência e confocal de varredura a laser demonstrou que os biofilmes de *C. albicans* são altamente heterogêneos, sendo compostos de elementos celulares e não celulares. Em ambos os modelos, a resistência antifúngica das células aumentou com o desenvolvimento do biofilme. O biofilme formado sobre o silicone apresentou camadas internas formadas por densos aglomerados de leveduras, das quais partiram prolongamentos miceliais (hifas) que atravessaram um revestimento externo de polissacarídeos. Com a remoção mecânica do biofilme por meio de enxágüe ou raspagem, ainda permaneceram as células basais leveduriformes aderidas ao material de substrato. A expressão de genes do tipo aglutinina, que codificam proteínas envolvidas na adesão às estruturas do hospedeiro, foi regulada diferentemente de células planctônicas e de

Revisão da

literatura

células no biofilme. Ao contrário da *C. albicans*, o *S. cerevisiae* não apresentou capacidade de formar biofilme maduro, embora também tenha aderido às superfícies protéticas. Os resultados obtidos pelos autores permitiram, segundo eles, a identificação de bases para investigações dos mecanismos moleculares da biologia de biofilmes de *C. albicans* envolvidos na resistência antifúngica e forneceram meios para o desenvolvimento de novas terapias para infecções provocadas por biofilmes.

Hiti et al.⁴⁷, em 2001, avaliaram o efeito da irradiação por microondas na desinfecção de recipientes para armazenamento de lentes de contato contaminados com *Acanthamoeba*. Os recipientes para armazenamento de lentes de contato foram contaminados (10^6 células/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 3 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 tornam-se sensíveis à irradiação por microondas. Por outro lado, a célula desidratada não apresenta essa vibração molecular e, por isso, a efetividade das microondas, nessas condições, é significativamente reduzida.

De acordo com Althertun e Carvalhal³, em 2002, do ponto de vista microbiológico, os microrganismos são considerados mortos quando perdem, de forma irreversível, a capacidade de se multiplicar. O método físico mais



Revisão da

literatura

empregado para inativar microrganismos é o calor seco ou úmido pela denaturação de proteínas ou por oxidação, respectivamente. Há variações de resistência de organismo para organismo. Essas diferenças podem ser expressas através de três parâmetros: ponto de morte térmica, que é a temperatura mais baixa capaz de inativar todos os microrganismos de uma dada espécie, em suspensão, em 10 minutos; tempo de morte térmica, que é o menor tempo capaz de inativar todos os microrganismos, numa suspensão, numa determinada temperatura; e tempo de redução decimal (D), que é o tempo expresso em minutos, no qual 90% da população são inativadas, numa dada temperatura. A fervura é capaz de inativar as formas vegetativas dos patógenos, muitos vírus, fungos e seus esporos em até 15 minutos. Embora não seja considerada uma forma de esterilização, esse método pode tornar seguros alimentos e água para o consumo. A esterilização empregando calor úmido requer temperaturas acima do ponto de ebulição da água, o que é conseguido através da utilização de autoclaves durante 15 minutos. O calor seco, por sua vez, pode ser aplicado por meio de flambagem, incineração ou propagação do calor em atmosfera. Neste último caso, o binômio tempo/temperatura deve ser rigorosamente observado. As radiações foram descritas pelos autores como: ionizantes ou não-ionizantes, sendo estas últimas de frequência mais curta, maior energia e maior poder de penetração. Os fornos de microondas, de acordo com os autores, têm sido cada vez mais utilizados em laboratórios e as radiações emitidas não afetam diretamente os microrganismos, mas geram calor. Relataram que são escassos os trabalhos que investigaram esse agente de esterilização, mas afirmaram que o calor gerado é o responsável pela inativação dos microrganismos.

As microondas foram testadas por Karabulut e Baykal⁵⁸, em 2002, para o controle de desenvolvimento de patógenos em cultura de pêssegos, após a colheita. Os autores inocularam dois microrganismos em frutos recém colhidos para permitir o desenvolvimento de cavidades. Além disso, avaliaram o desenvolvimento natural de cavidades nos frutos, ou seja, sem a inoculação de

Revisão da

literatura

microrganismos. Imediatamente após a inoculação, os frutos foram colocados dois a dois em forno de microondas convencional com frequência de 2450 MHz e submetidos à irradiação durante 2 minutos. Após isso, os pêssegos foram armazenados a 0°C durante 45 dias e a 24°C durante 5 dias. Como grupo controle foram utilizados frutos colhidos e armazenados sob as mesmas condições, mas que não foram submetidos à irradiação de microondas. Os autores avaliaram o diâmetro das cavidades desenvolvidas, firmeza, massa e porcentagem de conteúdo de sólidos. As microondas reduziram significativamente a porcentagem de lesões de infecção e o diâmetro das cavidades, tanto para o grupo inoculado quanto para o grupo de cavidades naturais. Os autores concluíram que o tratamento com microondas é um método viável para o controle não-químico das doenças incidentes nos pêssegos após a colheita.

Goodson et al.⁴², em 2003, testaram a efetividade de um agente para a limpeza de próteses totais disponível comercialmente, associado à irradiação de microondas na desinfecção das próteses. 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 obtidos foram avaliados quanto à sua contaminação inicial por meio do contato da região correspondente às superfícies externa e interna das próteses, e também da região ao longo da secção realizada com três diferentes meios de cultura específicos para leveduras, microrganismos facultativos/anaeróbios e microrganismos que exigem nutrientes especiais. A seguir, parte das próteses foi submetida imediatamente aos seguintes sistemas 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 três vezes, e, após cada

Revisão da

literatura

procedimento de limpeza todos os fragmentos foram cultivados da mesma maneira como foi descrito anteriormente. Foram realizadas contagens das ufc antes e após cada um desses procedimentos de limpeza. 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 romper o ciclo de reinfecção dos pacientes pelas próteses contaminadas com os microrganismos causadores de candidose oral, entre os quais a *C. albicans*.

O estudo de Neppelenbroek et al.⁷⁷, em 2003, teve por objetivo avaliar 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 (10⁷ ufc/mL) com TSB contendo um dos seguintes microrganismos: *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa*. Após a inoculação, 40 corpos-de-prova de cada material foram imersos em 200 mL de água e irradiados a 650 W por 6 min. Quarenta corpos-de-prova não irradiados foram utilizados como controle positivo. A seguir, a suspensão resultante foi semeada 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. 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 min a 650 W provou ser um método efetivo para a esterilização de resinas reembasadoras rígidas.

Revisão da

literatura

Devido às propriedades antifúngicas do óleo da árvore de chá (*Melaleuca alternifolia*), Hammer et al.⁴⁴, em 2004, investigaram o mecanismo de ação desse óleo e seus componentes contra os microrganismos *C. albicans*, *C. glabrata* and *S. cerevisiae*. Cepas padrão dessas leveduras foram incubadas com o óleo de árvore do chá, ou com 7 substâncias presentes no mesmo, em diferentes concentrações, por 20 segundos, 1, 2, 4 e 6 e horas. Durante esse período, as alterações de permeabilidade foram avaliadas quanto à liberação de substâncias celulares para o meio extracelular, e quanto à penetração do corante azul de metileno nas células. Para a avaliação de liberação de substâncias, as células que entraram em contato com o óleo e seus componentes foram filtradas em membrana com poros de 0,45 μm e o filtrado foi avaliado quanto à sua absorvância a 260 nm. Para avaliação da penetração do corante azul de metileno, alíquotas das suspensões celulares foram ressuspensas em solução contendo o corante. Foram, então contadas 100 células de campos microscópicos consecutivos, distinguindo as células que permitiram das que não permitiram a entrada do corante. A fluidez de membrana foi medida por fluorescência com 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrieno. Os efeitos do óleo de árvore do chá sobre a acidificação de meio induzida por glicose foram avaliados pela monitoração do pH de suspensões celulares na presença de glicose e do óleo após 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 segundos do contato com o óleo. Para todos os experimentos, foram utilizados como controle as suspensões ou os filtrados de células não submetidas ao contato com o óleo e seus componentes. Os resultados demonstraram que o tratamento de *C. albicans* com o óleo e seus componentes em concentrações entre 0,25 e 1,0% (v/v) alteraram tanto a permeabilidade quanto a fluidez de membrana. A fluidez de membrana também aumentou quando a *C. albicans* foi cultivada por 24 horas com 0,016%–0,06% (v/v) de óleo. Para os três microrganismos, a acidificação do meio externo induzida por glicose foi inibida de maneira dose-dependente na presença de 0,2%, 0,3% e 0,4% de óleo. Com base nos resultados obtidos, os autores puderam sugerir a hipótese de que o óleo de árvore do chá



Revisão da

literatura

apresenta mecanismo antifúngico por alteração das propriedades de membrana e comprometendo as funções associadas à mesma.

Os mecanismos de destruição de coliformes fecais isolados de amostras de solo pelas microondas foram investigados por Hong et al.⁵⁰, em 2004, por meio de testes de viabilidade, sistemas de transporte de elétrons (STE), análises de atividade enzimática e electroforese em gel e densidade óptica de DNA genômico. Amostras de biosólidos obtidas de resíduos de esgoto urbano foram irradiadas em béqueres de 200 ml durante 30, 60, 90 e 120 segundos de irradiação, correspondendo a aumentos de temperatura 25 °C, 45 °C, 65 °C, 85 °C e 100°C, respectivamente. Amostras idênticas de biosólidos foram aquecidas em banho-de-água nas mesmas temperaturas atingidas pela irradiação como parâmetro de comparação dos efeitos das microondas. Além disso, os autores isolaram uma cepa da bactéria desse biosólido, ressuspenderam-na em suspensões aquosas e submeteram essas suspensões aos mesmos tratamentos térmicos de irradiação e aquecimento em banho-de-água. Culturas ou suspensões controle não foram submetidas a nenhum tratamento térmico. Para avaliação de viabilidade celular, os autores filtraram alíquotas das células submetidas aos tratamentos térmicos em membranas de 0,45 µm de poro e cultivaram essas células retidas no filtro. Para avaliação de integridade de membrana, os autores utilizaram um sistema para contagem de células à base de 2 corantes, um capaz de atravessar membranas celulares íntegras (SYTO 9) e outro capaz de atravessar membranas não-íntegras (propidium iodide). Os autores avaliaram a respiração celular pela atividade da enzima desidrogenase (STE) e a assimilação de carboidrato pela atividade da β-galactosidase. Além disso, avaliaram o conteúdo de DNA genômico que permaneceu no interior das células irradiadas, por meio de técnicas moleculares de extração de DNA. Esses autores verificaram que houve uma redução na concentração dessas moléculas nas células irradiadas avaliada por meio de eletroforese em gel e densidade óptica a 260 nm. De acordo com os autores, as injúrias na membrana celular das bactérias foram proporcionais ao aumento da temperatura e do tempo de irradiação e que após 60 segundos de exposição,

Revisão da

literatura

quando atingiu a temperatura de 100°C, todas as células perderam sua integridade de membrana.

O objetivo do estudo de Silva et al.⁹⁴, em 2004, foi avaliar a efetividade das microondas na inativação da *C. albicans* 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.⁷⁷, 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 crescimento de colônias nas placas referentes ao grupo de próteses irradiadas. Os autores concluíram que a irradiação por microondas durante 6 minutos a 650 W foi efetiva na esterilização de próteses totais contaminadas com *C. albicans*.

O estudo de Mima⁷³, em 2005, avaliou a efetividade de diferentes tempos de irradiação por microondas na desinfecção de uma resina rígida para reembasamento imediato. 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 (10⁷ ufc/mL) com TSB contendo um dos seguintes microrganismos: *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, 40 corpos-de-prova (n=10 para cada microrganismo) não foram desinfetados (G0 – controle positivo). Os demais (n=200) foram divididos em cinco grupos e submetidos à desinfecção em microondas, a uma potência de 650 W em um dos tempos experimentais (GI - 1 min; GII - 2 min; GIII - 3 min; GIV -



Revisão da

literatura

4 min e GV - 5 min). 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. 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 GIII, GIV e GV demonstraram efetiva esterilização após a irradiação em microondas. Para o grupo GII, após a irradiação por microondas, as amostras contaminadas com *C. albicans* foram esterilizadas, enquanto que as amostras contaminadas com as bactérias avaliadas apresentaram crescimento após 7 dias de incubação. Todos os corpos-de-prova do grupo GI apresentaram crescimento microbiológico após incubação por 48 h e 7 dias. A análise em MEV das amostras esterilizadas indicou alteração na morfologia celular dos microrganismos após irradiação em microondas. De acordo com os autores, 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 foram utilizados.

3 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da irradiação por microondas sobre células de *Candida albicans* em suspensão, por meio de três parâmetros de contagem celular e seis parâmetros de liberação de substâncias intracelulares.

4 Material e método

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais de consumo

- 1- Silicone RTV, Daltomare Ind. e Com. Ltda, Santo Amaro, SP
- 2- Gesso pedra Herodent tipo III, Vigodent S.A. Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ
- 3- Resina acrílica termopolimerizável para base de próteses Lucitone 550, Dentsply, Rio de Janeiro, RJ
- 4- Isolante para resina, Cel Lac, SSWhite, Rio de Janeiro, RJ
- 5- Dentes artificiais Vipident, Dental Vipi
- 6- Cera rosa nº 7, Wilson, Polidental Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP
- 7- Lixa d'água granulação 600, Norton
- 8- Pedra pomes em pó, Inodon Ind. Ed. Exp. Imp. Prod. Odontológicos
- 9- Branco de Espanha, K-dent, Quimidrol, Joinville, SC
- 10- Água destilada
- 11- Cultura de *C. albicans*, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA
Número (ATCC number): 10231
Distribuída por Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP
Número: IAL 89, Lote 03/04
- 12- Meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Cód 7164A
Lote nº 0012-108
- 13- Meio de cultura Sabouraud Agar, Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA.
Cod 7150A
Lote nº 0305-137



Material e

Método

- 14- Cloreto de sódio (PAACS), CAQ- Casa da Química Indústria e Comércio Ltda
- 15- Pontas descartáveis para micropipeta
- 16- Cloreto de sódio cristalino granulação grande Cisne, Refinaria Nacional de Sal S.A.
- 17- Gelo picado
- 18- Sistema Sensiprote, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG
- 19- Sistema para análise de proteínas Microprote, Doles Reagentes, Goiânia, GO
- 20- Sistema para análise de proteínas Proteínas Totais, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG
- 21- Sistema de análise de cálcio Cálcio Liquiform, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG

4.1.2 Instrumentos

- 1- Lâmpada de chama horizontal tipo Hanal
- 2- Espátula de aço inoxidável nº36, SS White Artigos Dentários
- 3- Pote para resina com tampa, Paladon
- 4- Muflas odontológicas metálicas nº 6, OGP Produtos Odontológicos
- 5- Câmara de Neubauer, Boeco, Alemanha
- 1- Placas de Petri pyrex 100 X 15 mm, Petriq
- 2- Tubos de ensaio pyrex nº 9820
- 3- Pipetas sorológicas descartáveis 10 mL, Costar
- 4- Béquer graduado, Vidrolabor
- 5- Erlenmeyer graduado, Vidrolabor
- 6- Micropipeta de 20-200 µL, Boeco, Alemanha
- 7- Micropipeta de 100-1000 µL, Boeco, Alemanha
- 8- Micropipeta de 5-50 µL, Boeco, Alemanha
- 9- Bico de Bunsen, OGP Produtos Odontológicos
- 10- Alça metálica para inoculação de microrganismos



Material e

Método

- 11- Alça de Drigalsky, Vidrolabor
- 12- Proveta graduada, Vidrolabor
- 13- Suporte de filtro com receptor Nalgene, Nalge Company, Rochester, EUA
- 14- Membranas de acetato de celulose com poro de 0,45 μm , código 11106-47N, Sartorius AG, Goettingen, Alemanha
- 15- Balão de borosilicato fundo redondo gargalo curto e junta esmerilhada fêmea 24/40 de 1000 mL, Boeco, Alemanha

4.1.3 Equipamentos

- 1- Termopolimerizadora Termotron
Modelo P100
Fabricada por Termotron do Brasil
- 2- Pipetador automático
Modelo: Eletrônico
Fabricado por Boeco, Hamburgo, Alemanha
- 3- Centrífuga Revan
Modelo: Ciclo CI
Fabricada por Revan do Brasil
- 4- Contador de colônias CP 600 Plus
Modelo: CP-600, n° série: 919
Fabricado por Phoenix - Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos LTDA, Araraquara, São Paulo, SP
- 5- Balança de precisão
Modelo: BG 400, n° 016450
Fabricada por Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP
- 6- Autoclave vertical
Modelo: AV 60 n° 6614
Fabricada por Phoenix - Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, São Paulo, SP

Material e

Método

- 7- Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP
Modelo: MA 033
Série: 9819
- 8- Agitador de tubos, fabricado por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP
Modelo: A 162
Série: 8187148
- 9- Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP
Modelo – MA 0324
Série – 9819011
- 10- Câmara de fluxo laminar vertical, fabricada por Pachane Indústria e Comércio Ltda, Piracicaba, SP
Modelo – PA 115
Número - 12898
- 11- Forno de microondas
Modelo: Sensor Crisp 38 – Sistema de dupla emissão de ondas
Fabricado por Brastemp, Manaus, AM
- 12- Microscópio óptico
Produzido por Carl Zeiss
- 13- Compressor e aspirador Fanen (Bomba de vácuo)
Modelo 089
Fabricado por Fanen Ltda, SP
- 14- Liofilizador
Modelo: FreeZone 6 Liter Benchtop Freeze Dry Systems
Fabricado por Labconco Corporation
Distribuído por Alemmar Com e Ind AS
- 15 Analisador de eletrólitos
Modelo: Electrocyte Analyser AVL 9180



Material e

Método

Fabricado por AVL Scientific Corporation, Roswell, Geórgia, EUA

16 Espectrofotômetro

Modelo 482

Fabricado por Femto Ind. Com. de Instrumentos Ltda

São Paulo, SP

4.2 Método

4.2.1 Confeção de próteses totais superiores acrílicas

Com o objetivo de simular as condições clínicas de desinfecção, foram confeccionadas oito próteses totais superiores de resina acrílica termopolimerizável. Para a obtenção dessas próteses, inicialmente foi confeccionado um molde de silicone industrial RTV a partir de um modelo padrão que simulava um rebordo alveolar edêntulo superior (Figura 1)⁷. A partir dessa matriz, foram confeccionados oito modelos idênticos em gesso tipo III. Para a confecção dos modelos, gesso pedra tipo IV foi espatulado manualmente, utilizando-se a proporção água/pó indicada pelo fabricante (22 mL/100 g). O gesso foi vazado sob vibração leve e constante, e, após a sua presa (45 min), os modelos foram retirados do molde de silicone RTV, e suas bases aplainadas com lixas d'água.

Material e

Método

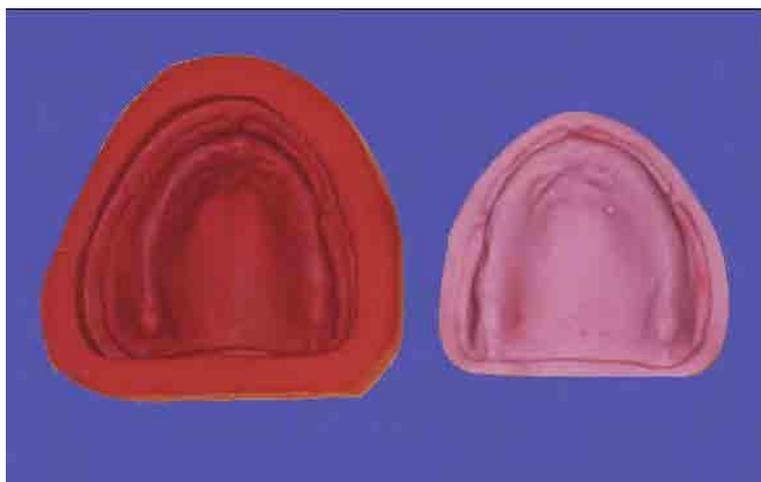


FIGURA 1– Molde em silicone RTV e modelo de gesso.

A seguir, sobre um dos modelos de gesso, foi confeccionado o enceramento de uma prótese total da seguinte maneira: primeiramente, foi realizado o isolamento do modelo com o isolante para resina acrílica Cel-Lac. Sobre esse modelo, foi confeccionada uma base de prova com resina acrílica quimicamente ativada e lâminas de cera rosa nº 7. Para isso, a resina acrílica, manipulada de acordo com as orientações do fabricante, foi acomodada sobre o modelo. Em seguida, um rolete foi confeccionado com uma lâmina e meia de cera rosa nº 7 dobrada no sentido longitudinal, em forma de sanfona, em faixas de 1 cm de largura. O acabamento do rolete de cera rosa nº 7 foi realizado com uma espátula nº 36 aquecida. Posteriormente, os dentes artificiais, modelo 2D/30M, cor 66, foram montados, e a escultura realizada na seguinte seqüência: enceramento, recorte do colo gengival, delineamento dos sulcos horizontais,

Material e

Método

esboço das bossas radiculares, acabamento da escultura e flambagem com lâmpada de chama horizontal que contribuiu para a obtenção de uma superfície de cera lisa e brilhante (Figura 2).

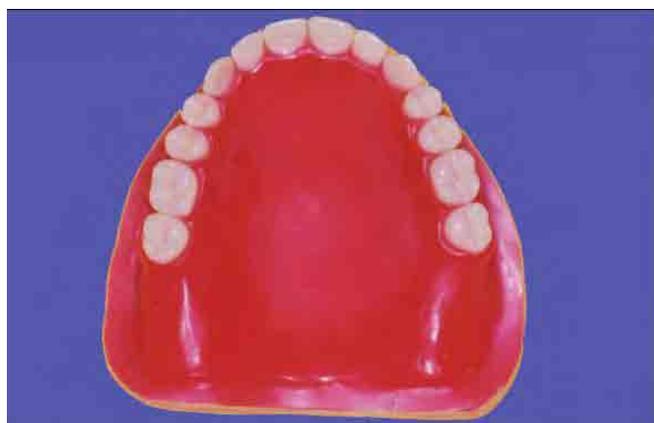


FIGURA 2- Prótese encerada sobre um dos modelos de gesso.

A seguir, foi confeccionada uma matriz de silicone RTV (Figura 3) pela moldagem dessa prótese total encerada para permitir o enceramento padronizado de cada uma das oito bases de prótese sobre os modelos de gesso. Conjuntos completos de dentes artificiais anteriores e posteriores, idênticos aos utilizados no enceramento da base de prótese, foram colocados nas suas lojas correspondentes da matriz de silicone e, a seguir, foi vertida cera rosa nº7 no estado fluido dentro da matriz. Imediatamente após, o modelo de gesso foi posicionado sobre o molde e aguardou-se o tempo de resfriamento/endurecimento da cera. O conjunto modelo, base de cera e dentes artificiais, foi retirado do molde de silicone e, a seguir, foi realizado o acabamento da escultura com o objetivo de remover porções de cera que recobriam os dentes artificiais, mantendo-os limpos e livres

Material e

Método

de qualquer excesso do material. Além disso, as regiões das bossas e das papilas interdentais foram arredondadas com o auxílio da lâmpada de chama horizontal que também contribuiu para a obtenção de uma superfície de cera lisa e brilhante.

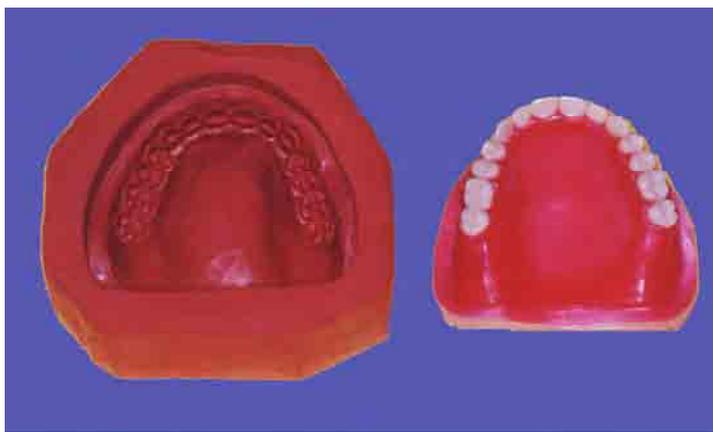


FIGURA 3– Matriz de silicone RTV da prótese encerada.

A seguir, realizou-se o processamento laboratorial de cada prótese encerada, juntamente com o modelo. Inicialmente, as próteses foram incluídas em mufla nº 6. Após a inclusão em mufla e a presa do gesso, a cera foi removida e o gesso da mufla e contra-mufla foi isolado com isolante para resina acrílica. A seguir, resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550 foi proporcionada (2,1 gramas de pó/10 mL de líquido), manipulada de acordo com as recomendações do fabricante e acomodada no interior do molde de gesso da mufla. A prensagem foi realizada em duas etapas (prensagem de prova e prensagem final) em prensa hidráulica. A mufla foi levada a uma polimerizadora, e foi realizado o ciclo curto de polimerização indicado pelo fabricante, em que a mufla foi imersa em água à temperatura de 73°C por 90 minutos e levada, a seguir, para 100°C por 30 minutos. Finalmente, a prótese foi demuflada e submetida a acabamento para remoção de irregularidades e polimento final, utilizando-se pedra trimer, lixa d'água, pedra pomes e branco de Espanha (Figura 4).

Material e

Método



FIGURA 4 – Prótese total após acabamento e polimento.

As próteses permaneceram imersas em água destilada durante a realização dos experimentos. Entretanto, essas próteses somente foram utilizadas após 88 dias, período necessário para atingirem saturação. A água de imersão foi substituída semanalmente e a estabilização na absorção de água foi verificada, diariamente, por meio da mensuração da massa em balança de precisão (Figura 5). Previamente à sua utilização nos tratamentos de desinfecção, as próteses foram esterilizadas em autoclave durante 20 minutos a 121°C, imersas em água destilada.

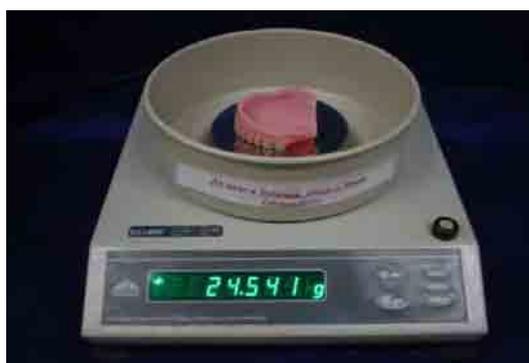


FIGURA 5 - Mensuração da massa das próteses em balança.

Material e

Método

4.2.2 Cultura de *C. albicans*

Para a realização do estudo, foi adquirida uma cepa de linhagem padrão de *C. albicans* ATCC 10231 liofilizada, contida em ampola lacrada. A ampola foi aberta em zona asséptica da chama do bico de Bunsen, e os microrganismos foram rehidratados em 5 ml de meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), em um tubo de ensaio, e incubados durante 24 horas. Após esse período, o tubo foi centrifugado a 2.000 rpm, durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e as células (sedimentado) foram ressuspensas em 36 mL de TSB estéril, acrescido de 4 mL de glicerol. Alíquotas de 1 mL dessa cultura foram congeladas em microtubos de 1 mL.

Para a realização dos experimentos, uma dessas alíquotas foi descongelada 48 horas antes de cada teste. Essa alíquota foi reativada em 5 mL de TSB contido em um tubo de ensaio, o qual foi incubado a 37°C durante 24 horas. A seguir, 600 µL dessa cultura dos tubos foram inoculados em 600 mL de TSB, divididos em dois frascos erlenmeyers com 300 mL cada, para a obtenção de uma nova cultura. Essa suspensão celular foi mantida sob agitação orbital dentro de estufa a 37°C durante 24 horas (Figura 6).



FIGURA 6 – Cultura de *C. albicans* em TSB.

Material e

Método

4.2.3 Determinação da concentração da cultura de *C. albicans*

Após o período de incubação, a concentração celular da nova cultura obtida foi verificada. Para isso, a cultura celular de cada erlenmeyer foi homogeneizada por agitação e uma alíquota de 500 μL sofreu diluição seriada em solução salina a 0,9% a partir da diluição de 10^{-1} até 10^{-2} . A seguir, 100 μL dessa suspensão foram diluídos em 900 μL de corante azul de metileno em um tubo de ensaio, obtendo-se uma diluição final de 10^{-3} .

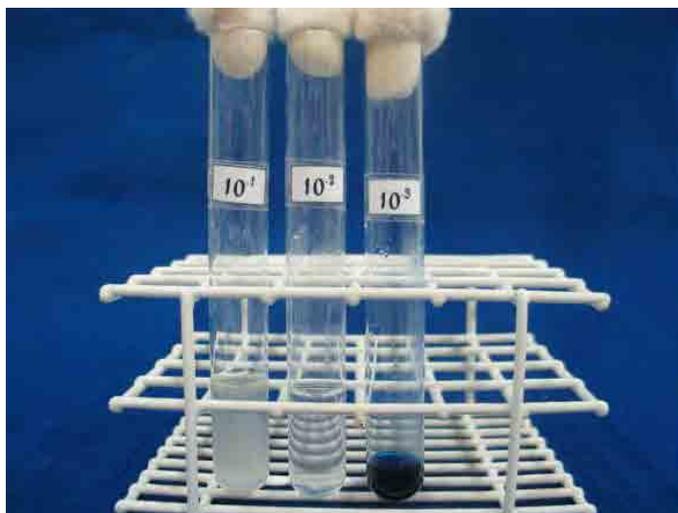


FIGURA 7- Diluição seriada da cultura e adição de corante Azul de metileno.

A suspensão celular obtida foi homogeneizada e dela foram retiradas duas alíquotas de 10 μL que foram levadas aos dois compartimentos (duplicata) de uma câmara de Neubauer (Figura 8) para contagem com o auxílio de um microscópio óptico (Figura 9).

Material e

Método



FIGURA 8- Colocação de suspensão celular em câmara de Neubauer.



FIGURA 9 - Contagem celular em microscópio óptico.

A câmara de Neubauer permite a contagem da concentração celular em microscópio de campo claro ou de contraste de fases. Trata-se de uma lâmina de vidro que contém uma depressão central, cuja parte inferior apresenta um quadro reticulado. Esse retículo é um quadrado de 3 mm x 3 mm, com uma distância entre duas linhas consecutivas de 0,25 mm. Cada quadrante externo, representado pela letra L, apresenta 1 mm² (Figura 10). A profundidade da depressão central é de 0,1 mm e o volume compreendido entre a superfície de cada quadrante e uma lamínula que colocada sobre a depressão é de 0,1 µL.

Material e

Método

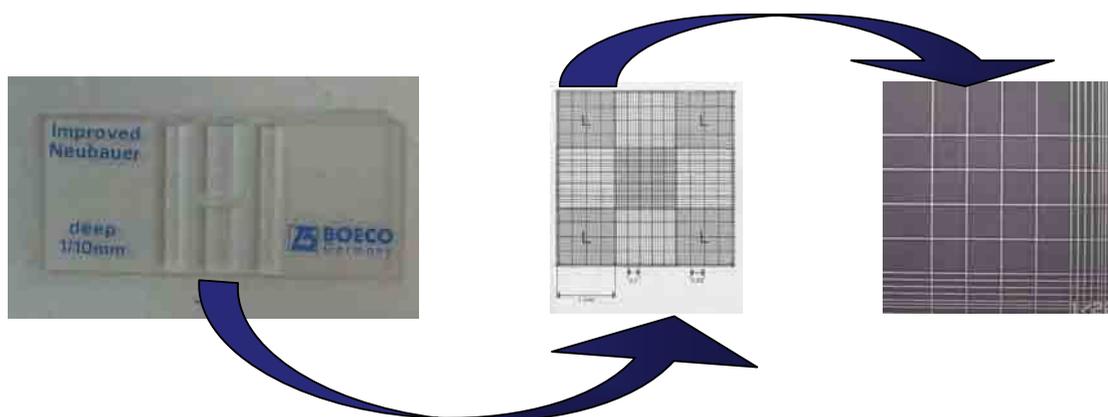


FIGURA 10- Câmara de Neubauer.

Por meio da contagem do número de células de cada um dos quatro quadrantes externos em microscópio óptico, foi obtido um total de células (x), e a concentração da suspensão celular foi calculada pela fórmula:

$$\text{Concentração da suspensão (células/mL)} = 10000 (x/4)$$

A contagem das células foi realizada em duplicata, e a concentração celular e o número total de células da cultura, a qual foi designada como Cultura Positiva, foram calculados. As células microbianas coradas pelo azul de metileno (não refringentes) foram excluídas da contagem do número de células íntegras uma vez que a penetração do corante no interior da célula indica alteração na parede e/ou membrana celulares. Além disso, para verificar uma possível contaminação durante os procedimentos de manipulação do microrganismo, alíquotas da cultura inicial foram diluídas até 10^{-6} (Figura 11) e semeadas em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose contendo $5 \mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol (ASD) (Figura 12).

Material e

Método



FIGURA 11- Diluição seriada da suspensão celular.



FIGURA 12- Semeadura em placa de Petri contendo ASD.

A seguir, o volume total da cultura dos microrganismos (600 mL) foi transferido para tubos cônicos estéreis com tampa do tipo Falcon com 50 mL de capacidade, que foram levados a uma centrífuga e centrifugados a 2.000 rpm durante 10 minutos (Figura 13). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi lavado 3 vezes com água Tipo I gelada e centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos, a fim de eliminar qualquer resíduo de meio de cultura e produtos extrametabólicos. Ao final da última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas (Figura 14) foram ressuspensas sob agitação em 400 mL de água Tipo I gelada. Dessa forma, padronizou-se a concentração do inóculo para 10^7 células/mL Um volume de 200 mL dessa suspensão foi transferido para um béquer de 600 mL para a realização dos tratamentos de desinfecção utilizados neste experimento (suspensão experimental) e os 200 mL restantes foram reservados em outro béquer similar para serem utilizados como suspensão controle.

Material e

Método



FIGURA 13– Centrifugação das células.



FIGURA 14 – Sedimentado celular.

4.2.4 Tratamento de irradiação com microondas

Para a realização do procedimento de irradiação em microondas, uma das próteses totais estéreis foi imersa na suspensão experimental de *C. albicans*. O béquer, contendo a prótese e a suspensão experimental, foi levado ao forno de microondas e irradiado a uma potência de 650 W por 6 minutos⁷⁷ (Figura 15).



FIGURA 15- Irradiação da suspensão celular e da prótese em microondas.

Material e

Método

O objetivo da colocação da prótese na suspensão celular foi a simulação das condições clínicas de esterilização de próteses. Em uma situação clínica, a prótese total, após sua remoção da cavidade bucal do paciente seria imersa em um recipiente contendo água em volume suficiente para sua completa imersão e posteriormente levada ao forno de microondas para a realização da irradiação. Durante esse procedimento, parte da energia das microondas seria absorvida pela prótese, alterando, assim, a quantidade de energia absorvida pelo microrganismo.

Imediatamente após o final da irradiação, o béquer contendo a suspensão experimental foi removido do forno de microondas, e a suspensão foi colocada em uma proveta com capacidade para 250 mL para verificação do volume de líquido perdido por evaporação durante o tratamento. Após o resfriamento natural da suspensão, o volume perdido foi substituído por água Tipo I até se obter novamente o volume de 200 mL. Para padronização dos procedimentos, a suspensão microbiana designada como suspensão controle também foi levada a uma proveta. Ambas as suspensões permaneceram em banho-de-gelo até que fossem utilizadas nos procedimentos de contagem celular e verificação da liberação de substâncias.

4.2.5 Contagem celular

As suspensões celulares experimental e controle foram submetidas aos procedimentos de contagem celular por meio de três técnicas: contagem em câmara de Neubauer, verificação da densidade óptica celular a 550 nm e contagem de unidades formadoras de colônia por mL (ufc/mL).

4.2.5.1 Contagem do número de células íntegras e não-íntegras em câmara de Neubauer

Para a contagem em câmara de Neubauer, cada suspensão celular foi homogeneizada por agitação e uma alíquota de 500 µL sofreu diluição seriada em solução salina a 0,9% a partir da diluição de 10^{-1} até 10^{-2} . A seguir, uma alíquota de 100 µL foi diluída em 900 µL de corante azul de metileno. A



Material e

Método

suspensão foi homogeneizada e duas alíquotas de 10 μL foram levadas aos dois compartimentos da Câmara de Neubauer para contagem em duplicata, com o auxílio de um microscópio óptico. Tanto o número de células íntegras, quanto o número de células não íntegras (que permitiram a entrada do corante) foram contados e registrados separadamente.

4.2.5.2 Verificação da densidade óptica a 550 nm

Para a verificação da densidade óptica, alíquotas de 5 mL das suspensões experimental e controle foram colocadas em tubos de ensaio estéreis. Os tubos foram centrifugados a 2.000 r.p.m. por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. As células sedimentadas foram, então, ressuspensas em água Tipo I no mesmo volume inicial (5 mL). A medida da densidade óptica foi realizada a 550 nm em espectrofotômetro calibrado, com água Tipo I (branco). Foram realizadas duas leituras para a suspensão experimental e duas para a suspensão controle (duplicata), e os valores foram registrados.

4.2.5.3 Contagem das unidades formadoras de colônia (número de células viáveis) por mL (ufc/mL)

A contagem das ufc/mL foi realizada por meio de semeadura, em duplicata. Para esse procedimento, alíquotas das suspensões experimental e controle foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-6} e plaqueadas em ASD com o auxílio de uma alça de Digalsky. Após 48 horas de incubação a 37°C , as colônias microbianas foram contadas em contador de colônias digital, tendo sido o número de ufc/mL calculado pela fórmula:



Material e

Método

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

onde n = valor absoluto da diluição e q = 0,025, que equivale ao volume de suspensão celular, em mililitros, pipetado em cada região de contagem do meio de cultura (ASD).

4.2.6 Quantificação da liberação de substâncias intracelulares

As suspensões experimental e controle foram submetidas a análises para a verificação da liberação de eletrólitos (Ca^{++} , Na^+ e K^+), ácidos nucleicos (DNA e RNA) e proteínas. Para a realização dos procedimentos de quantificação de substâncias liberadas, todas as células microbianas foram removidas de ambas as suspensões por meio de centrifugação seguida de filtração. Para a centrifugação, foram utilizados quatro tubos Falcon de 50 mL a 2.000 rpm durante 10 minutos. Para possibilitar a análise das substâncias liberadas, as células sedimentadas foram descartadas, e o sobrenadante foi filtrado em membranas de acetato de celulose com poros de 0,45 μm montadas em unidades de filtração, com o auxílio de bomba de vácuo (Figura 16).

Durante a padronização da metodologia para a quantificação de proteínas e eletrólitos, foi verificado que a concentração dessas substâncias tanto nas amostras da suspensão experimental quanto da controle localizou-se abaixo do intervalo de sensibilidade dos métodos que foram utilizados neste experimento. Assim, houve a necessidade de se aumentar a concentração dessas substâncias. Para isso, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização. Esse procedimento consiste na remoção da água ou de outro solvente de um produto congelado pelo processo de sublimação. Isso possibilita que, posteriormente, essas amostras possam ser ressuspensas em volume menor de água, conseqüentemente aumentando sua concentração. A liofilização por secagem congelada tem sido



Material e

Método

utilizada em inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos, na estabilização de matéria viva, tais como culturas microbiológicas, na preservação de peças de animais para exposição em museus, na restauração de livros e de outros itens danificados por água e no aumento da concentração e recuperação de produtos de reação.

Para possibilitar a liofilização, após a filtração das suspensões experimental e controle, as amostras de 200 mL foram transferidas para dois balões de vidro pyrex de 1.000 mL com fundo redondo e boca esmerilhada. Os balões de vidro contendo as amostras foram tampados e imersos em recipientes contendo gelo picado misturado com cloreto de sódio cristalino em granulação grossa para permitir o congelamento das amostras, que foram, em seguida, liofilizadas. Para a liofilização, as amostras foram congeladas nas paredes dos balões ocupando maior área de superfície. Isso foi possível através da rotação manual dos balões dentro do recipiente com gelo até a solidificação total das amostras. A seguir, os balões com as amostras congeladas foram levados ao liofilizador, onde permaneceram durante 24 horas até a secagem (liofilização) completa. Esse equipamento permitiu que, sob vácuo, a água das amostras passasse do estado sólido para o gasoso e que todo o restante do conteúdo da solução ficasse aderido às paredes internas dos balões.

A seguir, o liofilizado aderido às paredes do balão foi ressuspensão com o auxílio de 5 mL de água Tipo I, aumentando-se, dessa forma, a concentração das amostras em 40 vezes, uma vez que o volume inicial das mesmas era de 200 mL (Figura 17). As amostras assim obtidas foram, então, armazenadas a - 4°C até que fossem submetidas às análises de quantificação de substâncias liberadas.

Material e

Método



FIGURA 16- Unidade de filtração sob vácuo.

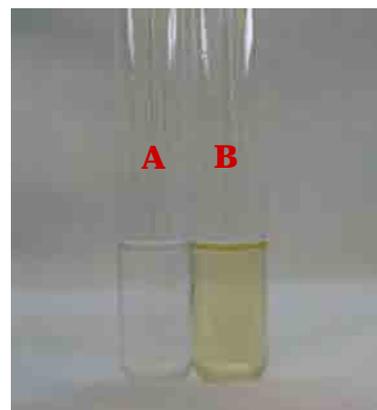


FIGURA 17- Amostras liofilizadas e ressuspensas. A- controle; B- experimental.

4.2.6.1 Quantificação da liberação de proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada por dois métodos colorimétricos: Método de Bradford e Método do Vermelho de Pirogalol.

4.2.6.1.1 Método de Bradford modificado¹³

O Sistema Microprote de quantificação de proteínas, baseado no método de Bradford, utiliza o corante Coomassie Azul Brilhante, que forma um complexo corado com albumina e diferentes variedades de globulinas, reagindo integralmente com todas as proteínas liberadas presentes na amostra. O sistema apresenta uma sensibilidade mínima de 0,8 µg de proteína e é composto de três reagentes: solução estabilizadora (solução 6,80 M de Ácido Perclórico),

Material e

Método

Comassie (solução 1,2 mmol de Azul de Comassie brilhante) e solução padrão (solução aquosa de albumina humana 10 mg/dL).

Para a análise, foram utilizados tubos de ensaio esterilizados rotulados da seguinte maneira: um tubo recebeu a identificação B (referente ao branco da reação); dois tubos receberam a identificação T (referente às amostras experimental e controle) e três tubos receberam a identificação P (referente à solução padrão de albumina bovina).

Em todos os tubos discriminados acima foram pipetadas alíquotas de 4 mL de corante. A seguir, os tubos T receberam 500 μ L da amostra experimental ou controle e os tubos P receberam o mesmo volume de solução padrão. Água Tipo I (500 μ L) foi pipetada em cada um dos tubos B. Após a homogeneização dos conteúdos de todos os tubos (Figura 18), suas absorbâncias foram mensuradas no prazo máximo de 30 minutos a 610 nm em espectrofotômetro, após o aparelho ter sido calibrado com o conteúdo do Tubo B (Figura 19).

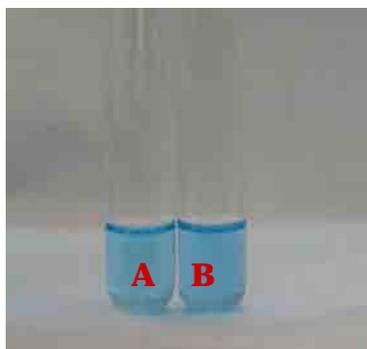


FIGURA 18- Amostras com reagente após homogeneização. A- controle; B- experimental.

FIGURA 19- Leitura da DO em espectrofotômetro.

Para o cálculo da quantidade de proteína da amostra, foi primeiramente determinado o fator de comparação (F). Este fator é dado pela fórmula:



Material e

Método

$$F = \frac{10}{\text{absorbância P} - \text{absorbância B}}$$

A seguir, calculou-se a quantidade de proteínas pela fórmula:

$$\text{Proteína da amostra (mg/dL)} = (\text{absorbância T} - \text{absorbância B}) \times (F).$$

O resultado obtido pela aplicação dessa fórmula foi, então, dividido por 40 para compensar o aumento de concentração proporcionado pela liofilização das amostras. Pelo procedimento de liofilização, as amostras foram concentradas 200 vezes. Após a ressuspensão do liofilizado em 5 mL de água, as amostras foram diluídas 5 vezes.

4.2.6.1.2 Método do Vermelho de Pirogalol¹⁰²

O sistema Sensiprote, que utiliza a metodologia do Vermelho de Pirogalol, apresenta um reagente de cor, contendo Vermelho de Pirogalol $\geq 60 \mu\text{ mol/L}$; molibdato de sódio $\geq 40 \mu\text{ mol/L}$; oxalato de sódio 1 mmol/L ; tampão 50 mmol/L , pH 2,5; octil fenol polioxietanol 0,1% e preservativos. O sistema apresenta, ainda, um reagente padrão à base de azida sódica a 0,05%. O reagente de cor reage com o molibdato de sódio, formando um complexo que, quando combinado com proteína em meio ácido, desenvolve um cromóforo azul, com o máximo de absorbância a 600 nm. A absorbância resultante é proporcional à concentração protéica da amostra. Para a análise, foram utilizados tubos de ensaio esterilizados que foram rotulados da seguinte maneira: um tubo recebeu a identificação B (referente ao branco da reação); dois tubos receberam a identificação T (referente às amostras experimental e controle) e três tubos receberam a identificação P (referente à solução padrão de albumina bovina). A seguir, os tubos T receberam 500 μL das amostras liofilizadas e que foram ressuspensas em 5 mL de água deionizada, e o tubo P recebeu volume igual de solução padrão. Água deionizada (500 μL) foi pipetada no tubo B, utilizado para comparação. Finalmente, foram pipetadas alíquotas de 1,0 mL de reagente de cor em cada tubo, os quais foram homogeneizados (Figura 20). As absorbâncias dos

Material e

Método

conteúdos dos tubos foram lidas a 600 nm, no intervalo de 30 minutos após a mistura. O espectrofotômetro foi calibrado com a leitura do Tubo B. Para o cálculo da quantidade de proteína da amostra, foi utilizada a fórmula:

$$\text{Proteína da amostra (mg/dL)} = \frac{\text{absorbância T} \times 50}{\text{absorbância P}}$$

O resultado obtido pela aplicação dessa fórmula foi dividido por 40 para compensar o aumento de concentração gerado pela liofilização das amostras. Pelo procedimento de liofilização, as amostras foram concentradas 200 vezes. Após a ressuspensão do liofilizado em 5 mL de água, as amostras foram diluídas 5 vezes.

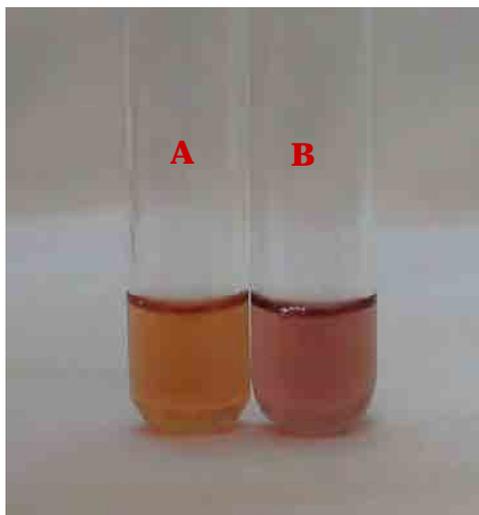


FIGURA 20- Amostras com reagente após homogeneização. A- controle; B- experimental.

Material e

Método

4.2.6.2 Quantificação de ácidos nucleicos

O conteúdo de ácidos nucleicos das amostras filtradas da mesma maneira descrita anteriormente foi estimado pela leitura direta da densidade óptica da amostra em espectrofotômetro UV a 260 nm.^{50,108} A leitura da densidade óptica foi realizada tendo o espectrofotômetro sido calibrado com água Tipo I.

4.2.6.3 Quantificação de Eletrólitos

4.2.6.4 Método de potenciometria

Para a verificação do conteúdo dos eletrólitos Na⁺ e K⁺, inicialmente as amostras experimental e controle foram homogeneizadas por agitação e uma alíquota foi analisada em um analisador de eletrólitos pela técnica da potenciometria (Figura 21).



FIGURA 21- Analisador de eletrólitos.

4.2.5.5 Método da cresolftaleína complexona

Para a verificação do conteúdo de Ca⁺⁺, inicialmente as amostras experimental e controle foram homogeneizadas por agitação e analisadas com o auxílio do sistema Cálcio Liquiform. O sistema Cálcio Liquiform, pela metodologia da cresolftaleína complexona, utiliza o Reagente 1, contendo tampão 920 mmol/L, pH 12, azida sódica 19 mmol/L; o Reagente 2, contendo o-cresolftaleína complexona 320 µmol/L, hidroxiquinoleína 13 mmol/L e ácido



Material e

Método

clorídrico 130 mmol/L e um padrão contendo cálcio 10 mg/dL e formol a 0,1%.

Inicialmente, o reagente de trabalho foi preparado pela mistura de três volumes do Reagente 1 para um volume do Reagente 2. O reagente de trabalho foi proporcionado no mesmo dia da sua utilização, uma vez que permanece estável durante 8 horas após a mistura. As amostras experimental e controle foram acidificadas com a adição de HCl 6M (50% v/v) e aguardou-se 60 minutos para sua utilização. As análises foram realizadas em cubetas de quartzo para espectrofotômetro que foram rotuladas da seguinte maneira: 1 cubeta recebeu a identificação P (referente ao padrão da reação) e 2 tubos receberam a identificação T (referente às amostras experimental e controle). Em todas as cubetas foi pipetado 1 mL de reagente de trabalho. Na seqüência, a cubeta T foi levada ao espectrofotômetro a 570 nm e o aparelho foi calibrado. A seguir, sem movimentar os controles do instrumento, foram adicionados 0,02 mL das amostras nas respectivas cubetas T, as quais foram homogeneizadas e tiveram suas absorbâncias mensuradas. Em seguida, a cubeta P foi levada ao espectrofotômetro a 570 nm e o aparelho foi calibrado. Em seguida, sem movimentar os controles do instrumento, foram adicionados 0,02 mL do Padrão, o conteúdo foi homogeneizado e a absorbância foi mensurada.

Para o cálculo da quantidade de cálcio da amostra, foi utilizada a fórmula:

$$\text{Cálcio da amostra (mg/dL)} = \frac{\text{absorbância T} \times 10}{\text{absorbância P}}$$

4.3 Metodologia estatística

No presente estudo, foram efetuadas contagem celular e quantificação da liberação de substâncias intracelulares em suspensões de culturas submetidas à irradiação por microondas e em suspensões tomadas como controle. Quanto ao controle, supõe-se corresponder o índice máximo de contagem celular e o mínimo de liberação de substâncias. As contagens celulares e as quantificações da



Material e

Método

liberação de substâncias foram sempre realizadas em duplicata e as médias dessas duplicatas foram utilizadas na análise estatística.

De acordo com a metodologia empregada, as culturas experimentais e controle forneceram resultados considerados pareados. Assim, empregaram-se procedimentos estatísticos apropriados para esses dados. Foi utilizado o teste *t* de Student, ao nível de 5% de significância, para a comparação das médias de dados pareados. O teste *t* exige a normalidade, pelo menos aproximada, das diferenças entre as determinações realizadas nas amostras do grupo controle e nas amostras do grupo experimental. A quantidade de dados empregados não foi suficiente para testar essa pressuposição e, então, quando colocada em dúvida, foi empregado para a comparação das médias o teste não-paramétrico de Wilcoxon, também ao nível de 5% de significância.

O coeficiente de correlação de Pearson (ou por postos de Spearman, no caso de não-paramétrico) foi calculado para medir o grau de associação linear entre as variáveis: determinações na suspensão controle e determinações na suspensão experimental. A correlação linear forte permitiu a determinação de uma equação de regressão linear pela qual se pode prever valores de uma variável a partir de valores da outra.

5. Resultado

5.1 Contagem celular

O número de células íntegras e não-íntegras de *C. albicans* por mL de cada duplicata, para as suspensões controle e experimental, cuja contagem foi realizada pelo método da câmara de Neubauer, foi calculado, e os valores originais das médias das duplicatas estão descritos na Tabela A1 do apêndice. Devido à presença de zeros nos resultados, foi acrescentada uma unidade a cada valor de contagem possibilitando o cálculo de logaritmo. As contagens foram transformadas para logaritmo na base dez, e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Em relação à contagem celular na suspensão controle, os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que, em todas as médias das duplicatas, foram encontradas concentrações de células íntegras da ordem de 10^8 células/mL. Foi observado, ainda, que não houve células não-íntegras contáveis para nenhuma das repetições dessa suspensão. Em relação à contagem celular na suspensão experimental, os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que, em todas as médias das duplicatas, foram encontradas concentrações de células não íntegras da ordem de 10^8 células/mL. Além disso, pode ser observado que não houve células íntegras contáveis para nenhuma das repetições dessa suspensão. Considerando esses resultados, não houve necessidade de aplicação de teste estatístico para avaliar a diferença entre as médias de células íntegras e não-íntegras em uma mesma suspensão.

O número de células viáveis por mL de cada duplicata, determinado pela contagem de ufc de *C. albicans* após semeadura em ASD, para as suspensões controle e experimental, foi calculado, e os valores originais das médias das duplicatas estão descritos na Tabela A2 do apêndice. A transformação logarítmica também foi aplicada sobre as médias das duplicatas de ufc/mL, e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Em relação à contagem celular em número de ufc de *C. albicans* por mL, os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que não houve colônias contáveis para nenhuma das repetições na suspensão



Resultado

experimental, enquanto para a suspensão controle, em todas as placas de ASD, foram encontradas concentrações de ufc da ordem de 10^8 ufc/mL. Assim, não houve necessidade de aplicação de teste estatístico para avaliar a diferença de células viáveis entre as suspensões.

Na Tabela 1, juntamente com as médias logarítmicas das repetições ($n=8$) e desvios padrão, estão apresentados os coeficientes de correlação de Pearson (r) e a estatística do teste t de Student para a comparação das médias de dados pareados.

De acordo com a Tabela 1, não houve evidência de correlação linear significativa entre os logaritmos dos números de células íntegras da suspensão controle e das células não-íntegras da suspensão experimental determinados pelo método de Neubauer ($P=0,083$). Além disso, não houve evidência de diferença significativa entre as médias desses logaritmos de contagens ($P=0,312$). Os resultados obtidos para os logaritmos podem ser estendidos para os dados originais de contagem de células.

Para verificar se o número de células íntegras, avaliado pelo método de Neubauer, correspondia ao número de células viáveis em ufc/mL, obtidos pelo método de semeadura, também foi aplicado o coeficiente de correlação de Pearson (r). De acordo com os resultados, houve evidência de correlação linear significativa entre o número de células íntegras da suspensão controle determinadas pelo método de Neubauer e o número de células viáveis em ufc/mL ($p=0,841$). Além disso, não houve evidência de diferença significativa entre as médias dessas contagens ($P=0,885$), sendo todas da ordem de 10^8 .

Resultado

Tabela 1 – Médias e desvios padrão (DP) dos logaritmos de contagem de células íntegras e não íntegras de *C. albicans* (número de células/mL), pelo método de Neubauer e de células viáveis (ufc/mL), pelo método de semeadura. Coeficiente de correlação r e teste t de Student para comparação de médias de dados pareados

Repetição	Controle		Experimental		Células viáveis/mL	
	Íntegras	Não-íntegras	Íntegras	Não-íntegras	Controle	Experimental
1	8,36	0,00	0,00	8,43	8,68	0,00
2	8,48	0,00	0,00	8,44	8,39	0,00
3	8,42	0,00	0,00	8,64	8,35	0,00
4	8,65	0,00	0,00	8,61	8,47	0,00
5	8,90	0,00	0,00	8,90	8,20	0,00
6	8,00	0,00	0,00	8,53	8,30	0,00
7	8,27	0,00	0,00	8,17	8,30	0,00
8	8,47	0,00	0,00	8,48	8,73	0,00
Média	8,45	0,000	0,000	8,52	8,43	0,000
DP	0,26	0,000	0,000	0,21	0,19	0,000
r	0,647 ($P=0,083$)				-0,085 ($P=0,841$)	
t	1,089* ($P=0,312$)				0,150** ($P=0,885$)	

* Comparação entre células íntegras (controle do método de Neubauer) e não-íntegras (experimental do método de Neubauer)

** Comparação entre suspensão controle (método de Neubauer) e suspensão controle (contagem de ufc/mL)

As médias e os desvios padrão das leituras de densidade óptica (DO) a 550 nm para as suspensões controle e experimental podem ser visualizados na Tabela 2.



Resultado

Tabela 2 – Médias e desvios padrão (DP) de densidade óptica (DO) a 550 nm para as suspensões controle e experimental. Coeficiente de correlação r e teste t de Student para comparação de médias de dados pareados

Repetição	Controle	Experimental
1	1,810	1,780
2	1,747	1,730
3	1,452	1,454
4	1,428	1,348
5	1,360	1,137
6	1,710	1,730
7	1,137	1,161
8	1,313	1,335
Média	1,495	1,459
Desvio padrão	0,237	0,259
r	0,947 ($P<0,001$)	
t	1,194 ($P=0,272$)	

A análise dos resultados do teste t de Student não apontou diferença significativa entre as médias de DO ($P=0,272$) da suspensão controle e a da suspensão experimental. O coeficiente de correlação entre as medidas de DO para essas duas suspensões resultou em um valor próximo de um, indicando forte correlação linear entre essas medidas. O gráfico de dispersão da Figura 22 sugere que uma regressão linear é adequada para descrever os dados. A equação de regressão linear indicou que o valor obtido na suspensão controle para uma amostra praticamente se repete na suspensão experimental.

Resultado

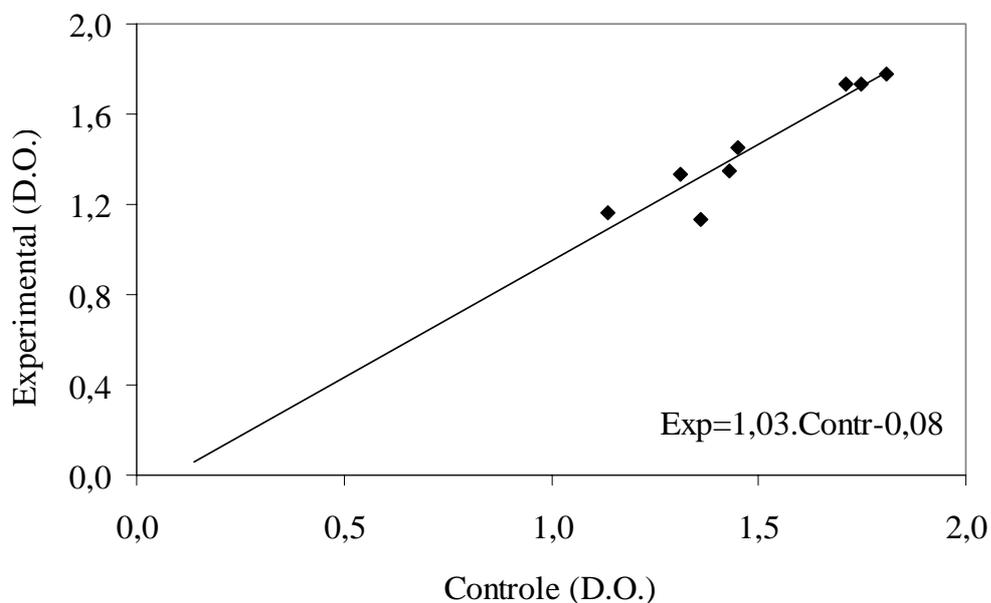


FIGURA 22- Diagrama de dispersão de D.O. a 550 nm para as suspensões controle e experimental.

5.2 Liberação de substâncias

5.2.1 Liberação de proteínas

Os valores originais das duplicatas referentes à leitura das densidades ópticas (DO) a 610 nm e 600 nm, para os sistemas Microprote e Sensiprote, respectivamente, estão descritos nas Tabelas B1 e B2 do apêndice.

A partir dos valores originais de DO dos sistemas Microprote e Sensiprote, de acordo com as fórmulas fornecidas pelos fabricantes dos sistemas, foram calculadas as médias das duplicatas de concentração de proteínas liberadas da suspensão controle e experimental. Esses valores, bem como os desvios padrão, são apresentados na Tabela 3.


 Resultado

Tabela 3 – Médias e desvios padrão (DP) de concentração de proteínas (mg/dL) determinados pelos sistemas Microprote e Sensiprote para as suspensões controle e experimental. Coeficiente de correlação r e teste t de Student para comparação de médias de dados pareados

Repetição	Sistema Microprote		Sistema Sensiprote	
	Controle	Experimental	Controle	Experimental
1	0,019	0,106	0,263	0,429
2	0,026	0,083	0,097	0,811
3	0,019	0,062	0,155	0,324
4	0,030	0,069	0,256	0,533
5	0,028	0,080	0,122	0,375
6	0,033	0,156	0,072	0,263
7	0,017	0,069	0,126	0,277
8	0,026	0,087	0,126	0,328
Média	0,025	0,089	0,152	0,418
DP	0,006	0,030	0,071	0,181
r	0,505 ($P=0,202$)		0,123 ($P=0,772$)	
t	6,530 ($P<0,001$)		4,026 ($P=0,005$)	

Na Tabela 3, é possível observar que, para os dois sistemas, não houve evidência de correlação forte entre as concentrações de proteínas determinadas na suspensão controle e na experimental, de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson. Entretanto, houve evidência de diferença significativa entre as médias de concentração de proteínas das suspensões controle e experimental, de acordo com o teste t de Student para dados pareados. A média de concentração de proteína na suspensão experimental foi significativamente maior do que na suspensão controle, tanto para o sistema Microprote ($P=0,005$) como para o sistema Sensiprote ($P<0,001$). A Figura 23 permite a visualização da diferença entre as médias das suspensões controle e experimental para os sistemas de análise utilizados.

Resultado

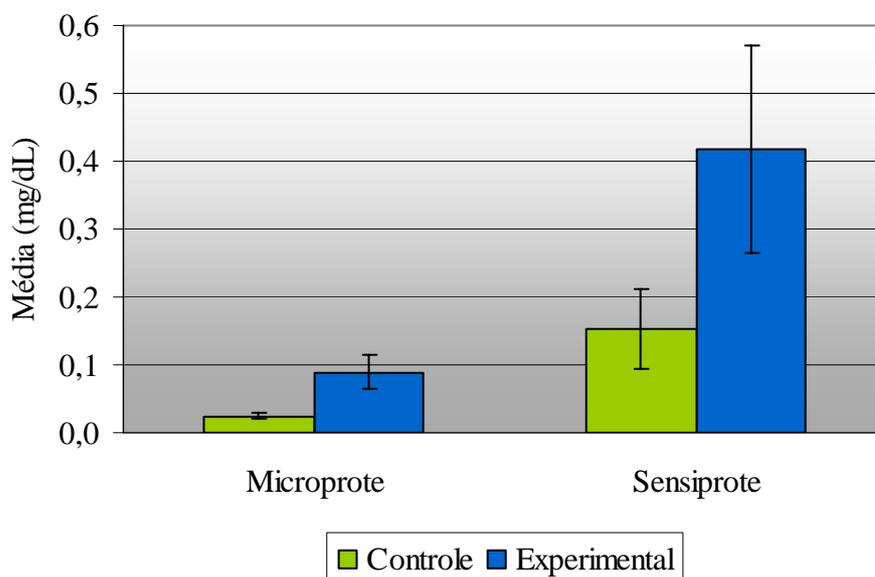


FIGURA 23- Médias de concentração de proteínas, em mg/dL, determinadas pelos sistemas Microprote e Sensiprote. Barras verticais: Intervalo de confiança (95%).

5.2.2 Liberação de K^+

As médias e os desvios padrão das duplicatas de concentração de K^+ (em mmol/L) da suspensão controle e da suspensão experimental, quando avaliados pelo método de potenciometria, podem ser visualizados na Tabela 4. As concentrações de K^+ que não puderam ser determinadas por se localizarem abaixo do limite de detecção do método de potenciometria foram consideradas como 0.


 Resultado

Tabela 4 – Médias e desvios padrão (DP) da concentração de K^+ (mmol/mL) determinada pelo método de potenciometria para as suspensões controle e experimental. Coeficiente de correlação r e teste t de Student para comparação de médias de dados pareados

Repetição	Controle	Experimental
1	0,0	23,1
2	1,7	33,0
3	2,0	25,2
4	2,7	32,7
5	0,0	27,0
6	1,4	27,0
7	0,0	22,8
8	0,0	18,7
Média	1,0	26,2
DP	1,1	4,9
r	0,748 ($P=0,033$)	
t	17,219 ($P<0,001$)	

De acordo com o teste t de Student (Tabela 4), foi possível observar evidência muito forte de diferença entre as médias de concentração de K^+ da suspensão controle e da suspensão experimental ($p<0,001$). Além disso, de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson, houve evidência de correlação significativa entre as concentrações de K^+ dessas suspensões. Entretanto, como os valores não detectáveis foram considerados zero, o coeficiente de correlação não expressou fielmente a relação entre essas duas variáveis. Assim, a comparação das médias pelo teste t explica melhor as diferenças entre as concentrações das suspensões experimental e controle.


 Resultado

5.2.3 Liberação de Ca⁺⁺

As médias e os desvios padrão das duplicatas de concentração de Ca⁺⁺ (mg/dL) das suspensões controle e experimental, quando avaliadas pelo sistema Liquiform, são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Médias e desvios padrão (DP) da concentração de Ca⁺⁺ (mg/dL) determinada pelo sistema Liquiform para as suspensões controle e experimental. Coeficiente de correlação por postos de Spearman (r_s) e teste z de Wilcoxon para comparação de médias de dados pareados

Repetição	Controle	Experimental
1	1,3	1,8
2	0,7	8,8
3	0,2	0,7
4	0,2	0,6
5	0,5	1,0
6	0,2	0,8
7	0,6	3,7
8	1,8	7,5
Média	0,7	3,1
DP	0,6	3,3
r_s	0,854 ($P=0,007$)	
z	2,521 ($P=0,012$)	

O teste t de Student não apontou diferença significativa entre as médias, embora esse tenha sido um resultado marginal ($P=0,055$). Pela observação da



Resultado

distribuição das diferenças entre os valores de concentração de Ca^{++} , a validade do teste pode ser colocada em dúvida. Por esse motivo, foi aplicado o teste não-paramétrico de Wilcoxon que apontou diferença significativa entre as médias de concentrações de Ca^{++} relativas às suspensões experimental e controle ($P=0,012$). Os resultados do Teste z de Wilcoxon podem ser visualizados na Tabela 5. O coeficiente de correlação por postos de Spearman (r_s) demonstrou um alto grau de associação entre a suspensão controle e a experimental ($P=0,007$).

5.2.4 Liberação de Na^+

O conteúdo de Na^+ das amostras não pôde ser detectado pela técnica de potenciometria tanto para as amostras controle quanto para as amostras experimentais.

5.2.5 Liberação de ácidos nucléicos (DNA e RNA)

Na Tabela 6 estão apresentadas as médias e desvios padrão do conteúdo de ácidos nucléicos (DNA e RNA) para as amostras da suspensão controle e da suspensão experimental.


 Resultado

Tabela 6 – Médias e desvios padrão (DP) das leituras de densidade óptica (DO) a 260 nm para as suspensões controle e experimental. Coeficiente de correlação por postos de Spearman (r_s) e teste z de Wilcoxon para comparação de médias de dados pareados

Repetição	Controle	Experimental
1	0,076	0,073
2	0,000	0,000
3	0,000	0,000
4	0,000	0,093
5	0,000	0,101
6	0,090	0,120
7	0,000	0,040
8	0,000	0,026
Média	0,021	0,057
DP	0,039	0,047
r_s	0,549 ($P=0,160$)	
z	0,943 ($P=0,046$)	

Como pode ser visualizado na Tabela 6, não houve evidência de correlação entre os valores de DO das suspensões controle e experimental ($P=0,160$). O teste t de Student indicou diferença significativa entre as médias das suspensões ($P=0,043$). Neste caso, também foi colocada em dúvida a confiabilidade do teste t de Student. Foi, então, aplicado o teste não-paramétrico z de Wilcoxon, que também apontou diferença significativa entre as médias das suspensões controle e experimental ($P=0,046$). O coeficiente de correlação por postos de Spearman (r_s) apresentou valor não significativo ($P=0,160$) igual a 0,549.

6 Discussão

O objetivo deste estudo foi investigar a existência de diferenças, na contagem celular e na concentração de substâncias intracelulares liberadas, entre suspensões de *C. albicans* submetidas à irradiação por microondas e suspensões não irradiadas. Os dados obtidos dentro das condições experimentais do presente estudo confirmaram a hipótese de que, para a maioria dos métodos utilizados, a suspensão experimental apresentou valores significativamente menores de contagem celular e maiores de substâncias liberadas do que a suspensão controle.

A irradiação por microondas tem sido utilizada como método alternativo para a inativação de microrganismos presentes em alimentos^{19,26,58,79,86,97}, instrumentos médicos e laboratoriais^{11,43,60,90,92,110}, lentes de contato^{47,89}, objetos de uso doméstico⁵³, cosméticos, roupas íntimas⁴⁰, lixo hospitalar⁹⁸, e biosólidos.^{50,100} Em odontologia, como método alternativo para a desinfecção de fresas⁸⁸, peças de mão⁵¹, modelos de gesso²⁹, próteses removíveis parciais ou totais^{6,42,88,94,104} e resinas acrílicas utilizadas na confecção e no reembasamento dessas próteses.^{8,34,77} Neppelenbroek et al.⁷⁷ verificaram que a irradiação por microondas numa potência de 650 W por um período de 6 minutos foi efetiva na esterilização dos corpos-de-prova de resinas acrílicas para reembasamento imediato. No seu estudo, 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 à irradiação. 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). Dando continuidade ao tema, Silva et al.⁹⁴ contaminaram próteses totais com *C. albicans* e as submeteram às microondas utilizando o mesmo tempo e a mesma potência do estudo anterior. Esses autores observaram que as próteses foram esterilizadas. Entretanto, a interação direta entre a energia das microondas e os materiais biológicos, em instâncias moleculares e celulares, é pouco conhecida. Dessa forma, este estudo

Discussão

investigou como essa energia eletromagnética pode influenciar na integridade e na atividade microbiológica, promovendo a inativação da *C. albicans*.

Para a realização dos experimentos deste estudo, foram utilizadas suspensões celulares de *C. albicans* obtidas a partir de culturas em meio líquido, o que favoreceu o desenvolvimento do microrganismo na forma de leveduras, também denominada de blastósporo ou blastoconidia. As células leveduriformes, em brotamento ou não, têm sido consideradas as maiores constituintes de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos in vitro em corpos-de-prova de resina acrílica^{22,87} ou em fase inicial de biofilmes desenvolvidos em catéteres⁴⁵ e também são capazes de invadir os tecidos orais em invaginações mucosas, num processo que Calderoni e Fonzi¹⁷ denominaram “*persorption*”. Além disso, devido ao seu menor volume, as leveduras penetram mais facilmente nas camadas de resina acrílica localizadas abaixo da superfície da prótese, permanecendo entre as cadeias poliméricas^{28,61}, o que dificulta a sua remoção por agentes químicos de desinfecção.^{23,62} Essa capacidade de penetração na resina pode ser responsável pelo alto grau de recorrência da candidose, após terapias antifúngicas, uma vez que é comum a reinfecção por cepas originais que causaram a infecção.^{70,105}

Um dos parâmetros utilizados no presente estudo para comparar a concentração celular entre as suspensões experimental e controle foi a contagem de células leveduriformes em câmara de Neubauer. Foi verificado que não houve diferença entre a concentração de células íntegras da suspensão controle e a de não-íntegras da suspensão experimental. Além disso, não foi observada redução no número total de células da suspensão irradiada quando comparadas com as células da suspensão não irradiada. Considerando esses resultados, pode-se sugerir que, embora as células tenham alterado a permeabilidade da membrana celular, elas não sofreram desintegração completa. Woo et al.¹⁰⁸ também verificaram que a concentração celular de suspensões de *E. coli* e *B. subtilis* expostas às microondas por 80 segundos não foi alterada em relação às células não irradiadas. Entretanto, esses autores utilizaram a densidade óptica para a avaliação da concentração celular. Embora no presente estudo o tempo de irradiação tenha sido maior do que o utilizado por esses autores e os microrganismos não sejam os mesmos,



Discussão

resultados similares foram obtidos. Ainda considerando os resultados obtidos por meio da contagem de células em câmara de Neubauer, não foram encontradas células íntegras na suspensão experimental, indicando que houve alteração de permeabilidade ou de integridade dessas estruturas nas células irradiadas. Além disso, as células dessa suspensão perderam sua característica de refringência, passando a apresentar coloração azulada, embora tenham preservado sua morfologia leveduriforme elipsoidal. Por outro lado, como seria de se esperar, as células do grupo controle apresentaram morfologia leveduriforme normal, elipsoidal e refringente. Em ambas as suspensões, ocasionalmente foram encontradas morfologias diferenciadas, tais como clamidósporos ou formas germinativas, as quais foram excluídas da contagem celular. De acordo com a padronização desse procedimento, a distinção entre células íntegras e não íntegras, realizada com base na entrada do corante azul de metileno no seu interior, é uma forma indireta de se avaliar a permeabilidade de membrana e parede celulares.⁴⁴ Método semelhante foi utilizado por Hong et al.⁵⁰ para avaliação de viabilidade celular de bactérias submetidas à irradiação. Os autores utilizaram um sistema para contagem de células à base de dois corantes, um capaz de atravessar membranas celulares íntegras (SYTO 9) e outro capaz de atravessar membranas não-íntegras (propidium iodide). Esses testes demonstraram que as injúrias na membrana celular das bactérias foram proporcionais ao aumento da temperatura e do tempo de irradiação e que, após 60 segundos de exposição, quando atingiram a temperatura de 100°C, todas as células perderam sua integridade de membrana. A membrana citoplasmática é composta, primariamente, de fosfolipídeos (20 a 30%) e proteínas (50 a 70%)⁸². Os fosfolipídeos formam uma bicamada na qual a maioria das proteínas está embebida. Cada molécula de fosfolipídeo contém uma cabeça polar, com carga elétrica (a terminação fosfato), e uma cauda apolar, sem carga elétrica (a terminação hidrocarbônica). Na bicamada fosfolipídica, as terminações apolares, insolúveis em água, estão do lado de dentro. Os fosfolipídeos tornam a membrana fluida, permitindo que os componentes protéicos se movimentem.^{1,82} Dessa forma, pode-se sugerir que essa fluidez, associada à presença de carga elétrica na cabeça polar, poderia, em tese, favorecer



Discussão

a movimentação das moléculas fosfolipídicas pela interação direta com as microondas.^{19,86} Se essa movimentação exceder a resistência elástica dos componentes da membrana, possivelmente ocorreria alteração da permeabilidade dessa estrutura. Outra explicação seria uma atuação indireta das microondas pela movimentação e pelo aquecimento das moléculas de água localizadas nas imediações das porções externas da bicamada fosfolipídica, o que causaria alteração na estrutura da membrana celular.⁸⁶ A parede celular dos fungos é a estrutura que mantém suas características morfológicas.²⁰ A manutenção da morfologia original das células irradiadas observada no presente estudo pode indicar que as microondas não foram capazes de romper as ligações químicas existentes entre os polissacarídeos e as glicoproteínas (glucanas, quitinas e mananas) constituintes das paredes celulares dos fungos. Esses polissacarídeos representam os principais componentes estruturais da parede celular do fungo, a qual forma um esqueleto rígido proporcionando resistência mecânica à célula. Além dessa função, a parede celular serve como uma barreira semipermeável controlando a evasão e o influxo de substâncias, entre as quais os corantes, nas células.²⁰ Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com a afirmação de Ponne e Bartels⁸⁶ e a de Verschaeve e Maes¹⁰¹, de que a quantidade de energia que um material absorve pela irradiação com microondas é insuficiente para quebrar ligações químicas fortes, embora possa causar alterações de permeabilidade de membranas fosfolipídicas. De acordo com Hong et al.⁵⁰, a energia de ativação das microondas é de aproximadamente 10^{-5} eV e seria insuficiente para romper ligações químicas covalentes (5 eV) e até mesmo ligações consideradas mais fracas como as pontes de hidrogênio (0,04 – 0,44 eV). Entretanto, esses autores afirmaram que as microondas podem afetar as ligações químicas, em determinadas circunstâncias, dependendo da quantidade de água presente nas imediações da parede celular. A proximidade das moléculas de água poderia alterar as propriedades dielétricas das substâncias que compõem a parede celular permitindo a movimentação, o aquecimento e possíveis alterações nessas estruturas.⁸⁶ Os resultados obtidos por Dreyfuss e Chipley³⁶ também sugerem que a irradiação em microondas, mesmo em doses subletais, causaria danos à

Discussão

integridade celular, uma vez que culturas de *S. aureus* irradiados em microondas sofreram maior lise do que células tratadas termicamente em banho-de-água. Essas informações estão de acordo com o estudo de Rosaspina et al.⁹⁰, que verificaram que a morfologia da parede celular de *C. albicans*, avaliada por microscopia eletrônica de varredura, foi alterada, após a exposição às microondas, proporcionalmente ao aumento do tempo de exposição, fato esse que não foi verificado nas células submetidas a aquecimento térmico convencional em banho-de-água. Esses autores sugeriram que o aquecimento em microondas apresentaria um efeito mais complexo nos microrganismos, além do térmico. Pakhomov et al.⁸¹, em uma revisão de literatura relacionada aos efeitos biológicos das ondas milimétricas, verificaram que a maioria dos trabalhos por eles avaliados encontrou efeitos não-térmicos associados às microondas. De acordo com Tajchakavit et al.⁹⁷, a energia de microondas foi mais eficiente na inativação de suspensões de *S. cerevisiae* e *L. plantarum* do que o aquecimento térmico convencional, mesmo quando temperaturas idênticas de aquecimento foram atingidas, sugerindo a possibilidade da existência de alguns efeitos não-térmicos ou de efeitos térmicos intensificados pelas microondas. O aquecimento observado nos materiais submetidos à irradiação ocorre pela interação do campo eletromagnético com as moléculas, uma vez que a energia de microondas é considerada “fria”. Em outras palavras, o aquecimento pelas microondas consiste em conversão de energia e não no aquecimento por propagação de calor. Segundo Carroll e Lopez¹⁹, a inativação microbiana por meio de irradiação com microondas poderia ocorrer de três modos: aquecimento mais rápido da célula microbiana do que do meio circundante (destruição térmica), rompimento mecânico das estruturas celulares pela oscilação de moléculas eletricamente carregadas e aquecimento seletivo de moléculas orgânicas essenciais seguido da sua denaturação. Atmaca et al.⁵ verificaram que o aumento do volume de líquido de suspensões bacterianas influenciou na absorção da energia de microondas, potencializando o seu efeito inibitório no crescimento de bactérias. Considerando os resultados obtidos nos estudos citados, o calor gerado durante a irradiação seria insuficiente para justificar o efeito letal nos microrganismos. Assim, um efeito resultante de



Discussão

alterações intracelulares específicas induzidas pelas microondas deve ser considerado.^{26,36,50,79,89,97,101} Entretanto, outros estudos sugerem que o calor gerado ao redor dos microrganismos pode ser o único fator responsável pela sua destruição.^{38,41,47,56,100,109} Fitzpatrick et al.³⁸ atribuíram o efeito da esterilização pelas microondas ao vapor produzido durante a irradiação dos microrganismos, sendo, portanto, um efeito térmico. Resultado semelhante foi obtido por Vela e Wu¹⁰¹, ao verificarem que a inativação de microrganismos presentes em amostras de solo, de leveduras, de bactérias e de vírus ocorreu em função do conteúdo de água das amostras. Fujikawa et al.⁴¹ não observaram diferença entre as cinéticas de destruição de *Esherichia coli* pela irradiação e por banho-de-água, concluindo que a inativação poderia ocorrer principalmente por efeitos térmicos. Jeng et al.⁵⁶ concluíram que não há efeitos não térmicos significativos em processos de esterilização em microondas a seco e que a atividade esporificada da energia de microondas é térmica. Yeo et al.¹⁰⁹ 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. Segundo Hiti et al.⁴⁷, a inativação pelas microondas ocorre devido à vibração das moléculas de água presentes na célula biológica, e, portanto, células com alto conteúdo de água em sua composição possuem maior interação com o campo eletromagnético. De acordo com os autores⁴⁷, isso justificaria o fato de que a efetividade das microondas é significativamente reduzida quando da irradiação de microrganismos desidratados. Watanabe et al.¹⁰³ concluíram que a inativação de *S. aureus* por irradiação de microondas ocorreu primariamente por efeitos térmicos, uma vez que sofreu maior influência da temperatura atingida durante a irradiação do que da irradiação propriamente dita. Como pôde ser verificado pela análise dos estudos citados, não existe consenso na literatura com relação à presença ou não de efeitos não térmicos. Essa falta de uniformidade de conclusões se deve à ausência de padronização metodológica e à utilização de diferentes microrganismos por esses estudos. Sendo assim, futuros estudos são, ainda, necessários para a elucidação desses aspectos. Entretanto,



Discussão

existe forte indicação de que a presença de água tanto no meio circundante quanto no interior das células influencia nas alterações celulares produzidas pelas microondas.^{5,47} Portanto, neste estudo, a presença de água tanto no meio extracelular quanto no interior da célula pode ter influenciado nas alterações das membranas e paredes celulares.

O parâmetro mais utilizado para verificar a destruição ou inativação dos microrganismos é sua capacidade de crescimento.³ No presente estudo, suspensões celulares na concentração de 10^8 ufc/mL foram 100% inativadas após a irradiação, ou seja, não foram encontradas colônias viáveis para contagem nas placas de Petri após 48 horas nas diluições de 10^{-1} a 10^{-6} . Esses valores estão de acordo com os resultados de contagem celular em câmara de Neubauer, que demonstraram alteração da integridade da membrana em todas as células leveduriformes da suspensão experimental, indicando que os danos causados pelas microondas também alteraram sua capacidade de multiplicação. Na consulta à literatura pertinente, não foram encontrados estudos que utilizassem as mesmas condições experimentais deste, isto é, a verificação da inativação de suspensões microbianas tem sido realizada utilizando-se diferentes volumes e concentrações de suspensão, outras espécies de microrganismos e outros tempos e potência de exposição às microondas.^{36,75,97,100,103} Em geral, nos estudos que utilizaram as microondas para irradiação de suspensões celulares, o tempo de irradiação necessário para a inativação dos microrganismos foi inferior ao utilizado neste estudo. Entretanto, é importante salientar que o volume e a concentração das suspensões microbianas utilizadas no presente estudo foram geralmente maiores do que os encontrados na literatura. A dose letal de irradiação está relacionada com tempo, potência, frequência e distância da fonte emissora das microondas.^{5,26,27,36,38,41,75,81,86} Além disso, a dose absorvida depende também do volume da suspensão, do tipo e da concentração do microrganismo, da forma do recipiente que contém a suspensão e da temperatura inicial da mesma.^{5,19,26,34,36,38,41,81,86,103} Watanabe et al.¹⁰³ demonstraram que a inativação da *C. albicans* com microondas foi efetivada pela irradiação durante 50 segundos a 500 W. Entretanto, esses autores utilizaram suspensões de volume (3 mL) e

Discussão

concentração (2×10^7 células/mL) expressivamente menores do que as utilizadas no presente estudo. A combinação de tempo e potência e das condições de irradiação utilizadas neste estudo foi estabelecida a partir da análise dos resultados obtidos na literatura^{6,8,14,34,88,89,99,104,110}, especialmente do trabalho de Neppelenbroek et al.⁷⁷ O volume de 200 mL de suspensão utilizado durante a irradiação corresponde ao volume mínimo de água necessário para a completa imersão de uma prótese total durante o procedimento de desinfecção em microondas. A irradiação de suspensões de *C. albicans* nas mesmas condições do presente estudo, porém com tempos e/ou potências de exposição menores, poderia fornecer informações adicionais sobre os efeitos dessa energia na inativação desse microrganismo e deveria ser objeto de estudos futuros.

A metodologia empregada não simulou as condições clínicas de aderência das células às superfícies das próteses. Logo, os resultados de inativação microbiana obtidos não podem ser extrapolados para as condições clínicas de esterilização de próteses. Entretanto, Silva et al.⁹⁴ verificaram que próteses totais contaminadas com *C. albicans* foram esterilizadas quando irradiadas a 650 W durante 6 minutos (imersas em 200 mL de água), uma vez que ocorreu inativação do microrganismo após sete dias de observação. Banting e Hill⁶ realizaram um estudo clínico em que avaliaram a efetividade da energia de microondas como coadjuvante no tratamento de candidose oral e verificaram que, após 90 dias de tratamento com a irradiação das próteses em microondas, a presença de pseudohifas na superfície das mesmas foi significativamente menor do que nas próteses que foram imersas em clorexidina. Goodson et al.⁴² 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. Outros estudos *in vitro* avaliaram a efetividade das microondas na inativação de *C. albicans* presente em resinas acrílicas.^{34,73,88} Mima⁷³ investigou amostras de uma resina para reembasamento contaminadas com *C. albicans* e irradiadas de 1 a 5 minutos a 650 W, tendo sido os corpos-de-prova imersos em



Discussão

200 mL de água. O autor verificou esterilização das amostras nos períodos de 2 a 5 minutos. Webb et al.¹⁰⁴ relataram que a irradiação com microondas por 6 minutos a 350 W eliminou o crescimento de *C. albicans* presentes nas superfícies de próteses totais irradiadas em condições a seco. Roher e Bulard⁸⁸ verificaram que a irradiação por microondas eliminou a *C. albicans* e outros microrganismos de próteses totais contaminadas após 10 minutos de irradiação a 720 W. Entretanto, as próteses foram acopladas a um dispositivo tridimensional rotatório para permitir a irradiação uniforme em toda a sua estrutura. Dixon et al.³⁴ verificaram que corpos-de-prova contaminados com *C. albicans* foram esterilizados após 5 minutos de irradiação com microondas à potência máxima, desde que os corpos-de-prova estivessem imersos em água durante a irradiação. Os resultados dos estudos acima citados, em conjunto com os resultados do presente estudo, sugerem que a *C. albicans*, aderida ou não às superfícies dos materiais utilizados na confecção das próteses, é efetivamente inativada pela irradiação com microondas. Portanto, pode-se sugerir que esse procedimento de desinfecção seja uma alternativa viável como coadjuvante no tratamento da estomatite protética de origem fúngica.

A análise da concentração de proteínas liberadas pelas suspensões celulares demonstrou que a quantidade de proteínas liberadas pela suspensão experimental foi significativamente maior do que a da suspensão controle, tanto para o método de Bradford¹³ quanto para o método do Vermelho de pirogalol.¹⁰² Esses resultados indicam que houve alteração de permeabilidade de membrana ou parede celulares. Em estudos anteriores, foram analisados extratos aquosos obtidos a partir de microrganismos irradiados, quanto ao conteúdo de proteínas totais, por meio de sistemas colorimétricos e que se baseiam na técnica de Bradford.^{36,108} Dreyfuss et al.³⁶, utilizando essa técnica¹³, verificaram que houve maior concentração de proteínas em extratos obtidos a partir de células irradiadas do que de células submetidas a tratamento térmico em banho-de-água, sugerindo que houve maior lise nas células irradiadas. Da mesma forma, Woo et al.¹⁰⁸, ao utilizarem a técnica de Bradford, verificaram aumento na quantidade de proteínas liberadas a partir de suspensões de *E. coli* e *B. subtilis* proporcional ao aumento



Discussão

do tempo de irradiação dessas suspensões. Nos estudos citados, não foi comparada a sensibilidade de diferentes métodos para detecção de proteínas. Embora esse não tenha sido o objetivo do presente estudo, a possibilidade de alteração da estrutura das moléculas das proteínas pela irradiação por microondas poderia promover alterações das suas propriedades físico-químicas. Essas modificações moleculares das proteínas poderiam alterar sua reatividade aos corantes, e, conseqüentemente, a mensuração de sua concentração.¹⁰² A hipótese de diminuição da sensibilidade do método pela alteração das moléculas de proteínas motivou a utilização de dois métodos de quantificação de proteínas no presente estudo, permitindo, assim, a comparação dos resultados. O sistema Microprote baseia-se na técnica de Bradford e o sistema Sensiprote baseia-se na ligação do complexo Vermelho de Pirogalol-molibdato de sódio às proteínas. As médias de concentração protéica, determinadas por ambos os sistemas, demonstraram que, embora esses sistemas tenham sido capazes de detectar as diferenças entre as duas suspensões, as médias de concentração protéica encontradas pelo Sensiprote foram maiores do que as do Microprote, como pode ser observado no gráfico da Figura 23. Não foram encontrados estudos na literatura pertinente que comparassem a técnica de Bradford com a técnica do Vermelho de pirogalol. O estudo de Watanabe et al.¹⁰² demonstrou que, para determinados tipos de proteínas, a técnica do Vermelho de pirogalol apresentou reatividade diferente da obtida por uma técnica comumente utilizada para determinação de proteínas de amostras clínicas. Outros estudos também têm demonstrado que os diversos métodos de determinação de proteínas apresentam graus diferentes de sensibilidade.^{32,65,83} Essa diferença de sensibilidade ocorre pelo fato de esses métodos possuírem, como base, diferentes propriedades físico-químicas das proteínas, e isso reforça a necessidade da utilização de mais de um método para a determinação da concentração de proteínas nesses estudos.¹⁰² Outro fator que pode ter contribuído para essas diferenças é que, durante a irradiação das amostras, as microondas podem ter promovido alterações de conformação¹⁰ ou de propriedades dielétricas das proteínas⁵⁰, modificando suas propriedades físico-químicas, e, conseqüentemente,



Discussão

sua reatividade com os corantes. Entretanto, essas informações necessitam ser confirmadas por meio de estudos bioquímicos.

Os íons Ca^{++} , Na^+ e K^+ desempenham funções celulares específicas e suas concentrações em relação ao meio extracelular são mantidas por mecanismos de transporte intramembranosos ativos.^{2,18,82} Neste estudo, a análise da concentração de Ca^{++} liberado pela suspensão experimental mostrou ter sido ela significativamente maior do que a da suspensão controle. Nas células de *C. albicans*, a porção mais significativa do conteúdo de Ca^{++} está localizada dentro dos vacúolos celulares ou mergulhada no citoplasma.¹⁸ Os vacúolos são estruturas limitadas por vesículas fosfolipídicas que se encontram mergulhadas no citoplasma. A presença do Ca^{++} é um dos fatores que regulam a transformação morfológica do microrganismo. Mecanismos de transporte intramembranosos regulam a passagem desse íon dos vacúolos para o citoplasma e vice-versa.¹⁸ O citoplasma, por sua vez, é composto primordialmente de uma matriz aquosa coloidal contendo sais, metabólitos, enzimas, açúcares, ácidos nucléicos, organelas e materiais de reserva de energia.^{2,82} De acordo com Ponne e Bartel⁸⁶, uma das regiões de interação das microondas com os materiais biológicos é o citoplasma devido à grande quantidade de moléculas de água da matriz coloidal. Segundo Culkin e Fung²⁶, as microondas promovem o aquecimento da matriz aquosa do citoplasma, causando rompimento ou alteração de permeabilidade às membranas fosfolipídicas que circundam os vacúolos e a membrana citoplasmática. Assim, os conteúdos maiores de Ca^{++} obtidos a partir de células irradiadas permitem sugerir que, após a irradiação, os íons Ca^{++} foram liberados dos vacúolos para o citoplasma e, posteriormente, para o meio extracelular.

A concentração de íons Na^+ e K^+ nas soluções obtidas a partir das suspensões controle e experimental foi determinada por meio de potenciometria.² De acordo com a metodologia empregada, não foi possível a detecção da concentração de Na^+ em nenhuma das suspensões celulares (experimental e controle), enquanto a concentração de K^+ foi determinada em ambas as suspensões, tendo sido a concentração deste íon na suspensão experimental significativamente superior à concentração na suspensão controle. Os íons K^+



Discussão

apresentam a função bioquímica de cofator enzimático, e, em condições normais, respondem por 40% da osmose citoplasmática, bem como controlam a resistência iônica do citoplasma. ² Além disso, o K^+ citoplasmático regula a diferença de potencial elétrico da membrana plasmática. Em uma célula normal, o meio intracelular possui uma concentração de íons K^+ aproximadamente 30 vezes maior do que o meio externo. A liberação de íons K^+ ocorrida nas células irradiadas pode ter contribuído para a inativação celular devido à sua função bioquímica como cofator enzimático. A concentração elevada desse íon no meio intracelular pode ser mantida por meio da bomba de Na^+ e K^+ presente nas membranas celulares. Essa bomba constitui-se de uma proteína que atravessa a membrana em toda a sua espessura, tendo uma molécula de adenosina tri-fosfato (ATP) unida à extremidade da proteína localizada próxima à região interna da célula. Os íons Na^+ , ligando-se a essa extremidade, quebram o ATP e alteram a conformação estrutural dessa proteína, o que favorece a saída desses íons da célula. Ao mesmo tempo, essa mudança estrutural da bomba fornece sítios de ligação favoráveis ao K^+ . A união de dois íons K^+ é suficiente para reconformar a bomba à sua estrutura inicial, ao mesmo tempo que introduz o K^+ no interior celular. ² Esse mecanismo fisiológico da célula favorece a presença de menores níveis intracelulares de Na^+ , o que poderia justificar sua dificuldade de detecção mesmo nas soluções obtidas a partir das células irradiadas.

A concentração relativa de ácidos nucleicos liberados pelas células de *C. albicans* foi avaliada neste estudo pela leitura direta da densidade óptica em espectrofotômetro UV a 260 nm. ^{44,50,108} Foi verificado que houve liberação significativamente maior dessas moléculas a partir das suspensões irradiadas, sugerindo a presença de alteração da permeabilidade de membranas. Os ácidos nucleicos encontram-se nas células dentro de organelas envolvidas por membranas fosfolipídicas, e, somente após a alteração destas membranas, essas moléculas poderiam ser liberadas do microrganismo para o meio extracelular. Foi verificado, pela contagem celular em câmara de Neubauer, que as membranas citoplasmáticas foram alteradas pela irradiação, sendo, portanto, provável que tenha ocorrido perda de integridade também das membranas das organelas, com



Discussão

conseqüente liberação dos ácidos nucléicos. Esses resultados estão de acordo com os do estudo de Woo et al.,¹⁰⁸ em que houve liberação de ácidos nucléicos pelos microrganismos estudados e essa liberação foi acentuada em temperaturas superiores a 40°C, indicando, segundo os autores, que as microondas promoveram lise de membrana celular nas células irradiadas. Além disso, Hong et al.⁵⁰ avaliaram o conteúdo de DNA genômico que permaneceu no interior das células irradiadas por meio de técnicas moleculares de extração de DNA. Esses autores verificaram que houve uma redução na concentração dessas moléculas nas células irradiadas avaliada por meio de eletroforese em gel e densidade óptica a 260 nm, reforçando a hipótese de que pode ocorrer alteração da permeabilidade das membranas fosfolipídeas das células irradiadas.

Os parâmetros para avaliação de contagem celular e liberação de substâncias intracelulares de células irradiadas utilizados neste estudo forneceram informações adicionais a respeito dos efeitos das microondas sobre a integridade e a função associadas a importantes estruturas, como membrana e parede celulares da *C. albicans*. De acordo com os resultados obtidos, as células irradiadas apresentaram sua permeabilidade de membrana e de parede celulares alterada e liberaram conteúdo intracelular. Apesar disso, as células não apresentaram redução no seu número pelo fato de não terem sofrido lise completa. Futuros estudos poderiam ser realizados para avaliar as alterações provocadas pelas microondas em microrganismos aderidos às próteses. Esses estudos, utilizando, por exemplo, técnicas moleculares de extração de DNA ou proteínas, permitiriam a avaliação de alterações moleculares empregando-se pequeno número de microrganismos, ao contrário da metodologia aplicada no presente estudo, que requer elevadas concentrações de células em suspensão. O aquecimento em banho-de-água poderia ser utilizado nesses estudos como parâmetro de comparação para a irradiação em microondas. Além disso, deveria ser realizado um estudo clínico, utilizando os mesmos tempo e potência, para avaliar a efetividade da irradiação de próteses em microondas, associada ou não com a utilização de antifúngicos, no tratamento de candidose oral.

7 Conclusão

Com base nas condições experimentais deste estudo, e de acordo com a metodologia empregada, pôde-se concluir que a irradiação de suspensões celulares de *C. albicans* com microondas a 650 W durante 6 minutos:

1. reduziu significativamente a concentração de células íntegras e aumentou a concentração de células não íntegras, de acordo com a contagem celular das suspensões em câmara de Neubauer;
2. não alterou o número total de células, de acordo com a contagem celular das suspensões em câmara de Neubauer;
3. reduziu significativamente a concentração de unidades formadoras de colônia por mL, de acordo com a contagem celular por semeadura das suspensões em placas de agar Sabouraud dextrose;
4. não alterou a concentração celular de acordo com a medida da densidade óptica das suspensões a 550 nm;
5. aumentou significativamente a concentração de proteínas no meio extracelular, de acordo com os sistemas Microprote e Sensiprote para análises de proteínas totais;
6. aumentou significativamente a concentração de K^+ e Ca^{++} no meio extracelular, de acordo com o método de potenciometria e pelo sistema Liquiform, respectivamente;
7. aumentou significativamente a concentração de ácido nucléicos (RNA e DNA) do meio extracelular, de acordo com a medida da densidade óptica a 260 nm.

8 Referências*

1. ABELSON, D.C. Denture plaque and denture cleansers. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 45, n. 4, p. 376-379, Apr. 1981.
2. ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3^a.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
3. ALTHERTUN, F.; CARVALHAL, M.L. Controle dos microrganismos. In: TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 3^a.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. cap. 7, p. 75-81.
4. ASSERY, M. et al. Control of microbial contamination with commercially available cleaning solutions. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 67, p. 275-277, Feb. 1992.
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. 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.
7. BARBOSA, D.B.; COMPAGNONI, M.A.; LELES, C.R. Changes in occlusal vertical dimension in microwave processing of complete dentures. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 3, p. 197-200, 2002.
8. 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.
9. 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.

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

Abstract

10. BOHR, H.; BOHR, J. Microwave-enhanced folding and denaturation of globular proteins. **Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics**, New York, v. 61, n. 4, p. 4310-4314, Apr. 2000.
11. BORDER, B.G.; RICE-SPEARMAN, L. Microwaves in the laboratory: effective decontamination. **Clin. Lab. Sci.**, Washington, v. 12, n. 3, p. 156-160, May/June 1999.
12. BRACE, M.L.; PLUMMER, K.D. Practical denture disinfection. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 70, n. 6, p. 538-540, Dec. 1993.
13. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, May. 1976.
14. BREEDING, L.C.; DIXON, D. Effect of repeated microwave irradiation on the bond strength of two denture soft liners. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 81, p. A-482-A-482, Mar. 2002.
15. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz textbook of clinical chemistry**. 2nd.ed. Philadelphia: Saunders, 1994.
16. BUTDZ-JORGENSEN, E. et al. Fluconazole in the treatment of Candida-associated denture stomatitis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 32, n. 12, p. 1859-1863, Dez. 1988.
17. CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, London, v. 9, n. 7, p. 327-335, July 2001.
18. CALVERT, C.M.; SANDERS, D. Inositol trisphosphate-dependent and -independent Ca²⁺ mobilization pathways at the vacuolar membrane of *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, n. 13, p. 7272-7280, Mar. 1995.
19. CARROLL, D.E.; LOPEZ, A. Lethality of radio-frequency energy upon microorganisms in liquid, buffered, and alcoholic food systems. **J. Food Sci.**, Champaign, v. 34, n. 5, p. 320-324, 1969.
20. CHAFFIN, W.L. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 62, n. 1, p. 130-180, Mar. 1998.

Abstract

21. CHAN, E.C. et al. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. **J. Calif. Dent. Assoc.**, Sacramento, v. 57, n. 12, p. 937-939, Dec. 1991.
22. CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, Sept. 2001.
23. CHAU, V.B. et al. In depth disinfection of acrylic resins. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 74, n. 3, p. 309-313, Sep. 1995.
24. COLE, E.C.; ROBISON, R. Test methodology for evaluation of germicides. In: ASCENZI, J.M. **Handbook of disinfectants and antiseptics**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-13.
25. COUNCIL ON DENTAL MATERIALS, INSTRUMENTS, AND EQUIPMENT. Denture cleansers. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 106, n. 1, p. 77-79, Jan. 1983.
26. 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, 1975.
27. DARDALHON, M.; AVERBECK, D.; BERTEAUD, A.J. Studies on possible genetic effects of microwaves in procaryotic and eucaryotic cells. **Radiat. Environ. Biophys.**, Berlin, v. 20, n. 1, p. 37-51, 1981.
28. DAVENPORT, J.C. The denture surface. **Br. Dent. J.**, London, v. 133, n. 3, p. 101-105, Aug. 1972.
29. DAVIS, D.R.; CURTIS, D.A.; WHITE, J.M. Microwave irradiation of contaminated dental casts. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 20, n. 8, p. 583-585, Aug. 1989.
30. DE CLERK, J.P. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.57, n. 5, p. 650-659, May. 1987.
31. DE NOBEL, H.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F.M. Cell wall maintenance in fungi. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 8, n. 8, p. 344-345, Aug. 2000.

Abstract

32. DILENA, B.A.; PENBERTHY, L.A.; FRASER, C.G. Six methods for determining urinary protein compared. **Clin. Chem.**, Washington, v. 29, n. 3, p. 553-557, Mar. 1983.
33. DILLS, S.S. et al. Comparison of the microbial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleansers. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 60, n. 4, p. 467-470, Oct. 1988.
34. 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.
35. DREIZEN, S. Oral candidiasis. **Am. J. Med.**, New York, v. 77, n. 4D, p. 28-33, Oct. 1984.
36. 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.
37. FARDAL, O.; TURNBULL, R.S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 112, n. 6, p. 863-869, June 1986.
38. 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.
39. FOTOS, P.G.; VINCENT, S.D.; HELLSTEIN, J.W. Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 74, n. 1, p. 41-49, July 1992.
40. FRIEDRICH, E.G. Jr.; PHILLIPS, L.E. Microwave sterilization of *Candida* on underwear fabric. A preliminary report. **J. Reprod. Med.** Chicago, v. 33, n. 5, p. 421-422, May 1988.
41. FUJIKAWA, H.; USHIODA, H.; KUDO, Y. Kinetics of *Escherichia coli* destruction by microwave irradiation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 58, n. 3, p. 920-924, Mar. 1992.

Abstract

42. 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.
43. 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.
44. HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 53, n. 6, p. 1081-1085, June 2004.
45. HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 39, n. 9, p. 2128-2131, Sept. 1995.
46. HENDERSON, C.V. 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.
47. 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.
48. HOAD-REDDICK, G.; GRANT, A.; GRIFFITHS, C.S. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 64, n. 1, p. 48-52, Mar. 1990.
49. 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.
50. HONG, S.M.; PARK, J.K.; LEE, Y.O. Mechanisms of microwave irradiation involved in the destruction of fecal coliforms from biosolids. **Water Res.**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 1615-1625, Mar. 2004.

Abstract

51. 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.
52. IACOPINO, A.M.; WATHEN, W.F. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 123, n. 1, p. 46-51, Jan. 1992. Erratum in: **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 123, n. 3, Mar. 1992.
53. IKAWA, J.Y.; ROSSEN, J.S. Reducing bacteria in household sponges. **J. Environm. Health**, Denver, v. 62, n. 1, p. 18-22, July/Ago. 1999.
54. JAGANATHAN, S.; LIN, C.C. Denture stomatitis: a review of aetiology, diagnosis and management. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 37, n. 2, p. 107-114, Apr. 1992.
55. 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.
56. JENG, D.K.H. et al. Mechanism of microwave sterilization in the dry state. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 53, n. 9, p. 2133-2137, Sept. 1987.
57. KAM, A.P.; XU, J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 43, n. 1, p. 19-28, May 2002.
58. KARABULUT, O.A.; BAYKAL, N. Evaluation of the use of microwave power for the control of postharvest diseases of peaches. **Postharvest Biol. Technol.**, Pullman, v. 26, p. 237-240, 2002.
59. KONSBERG, R., AXELL, T. Treatment of Candida infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 78, n. 3, p. 306-311, Sept. 1994.
60. 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.

Abstract

61. LEVIN, A.C. *Candida albicans* and acrylic resin. **J. Dent. Assoc. S. Afr.**, South Africa, v. 28, n. 4, p. 216-220, Apr. 1973.
62. 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.
63. LOVE, W.D. et al. The etiology of mucosal inflammation associated with dentures. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 18, n. 6, p. 515-527, Dec. 1967
64. McDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-179, Jan. 1999. Erratum in: **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 1, p. 227, Jan. 2001.
65. McELDERRY, L.A. et al. Six methods for urinary protein compared. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 2, p. 356-360, Feb. 1982.
66. MAHONEN, K.; VIRTANEN, K.; LARMAS, M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 304-310, Apr. 1998.
67. MANIATIS, T.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. 3v.
68. MARSH, P.D.; PERCIVAL, R.S.; CHALLACOMBE, S.J. The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 71, n. 7, p. 1374-1381, July 1992.
69. MASS, A.H.R. et al. **Ionized calcium, sodium and potassium by selective electrodes**. Oslo: Copenhagen. Private Press, 1984.
70. MATHABA, L.T.; DAVIES, G.; WARMINGTON, J.R. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 42, n. 5, p. 372-379, May 1995.
71. MEULEMANS, O. Determination of total protein in spinal fluid with sulphosalicylic acid and trichloroacetic acid. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 5, p. 757-761, Sept. 1960.

Abstract

72. MIKKONEN, M. et al. Prevalence of oral mucosal lesions associated with wearing removable dentures in Finnish adults. **Community Dent. Oral Epidemiol**, v. 12, n. 3, p. 191-194, Jun. 1984.
73. MIMA, E.G.O. **Efeito do tempo de irradiação sobre a efetividade da desinfecção em microondas de uma resina para reembasamento**. 149 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
74. MONSENEGO, P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study “in vivo”. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 708-713, Aug. 2000.
75. 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.
76. NAKAMOTO, K.; TAMAMOTO, M.; HAMADA, T. Evaluation of denture cleansers with and without enzymes against *Candida albicans*. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 66, n. 6, p. 792-795, Dec. 1991.
77. NEPPELENBROEK, K.H. et al. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside reline resins. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 16, n. 6, p. 616-620, Nov./Dec. 2003.
78. NIKAWA, H. et al. A review of *in vitro* and *in vivo* methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 12, n. 2, p. 153-159, Mar./Apr. 1999.
79. OLSEN, C.M. Microwaves inhibit bread mold. **Food Eng.**, p. 51-53, July 1965.
80. OLSEN, I. Denture stomatitis. Effects of chlorhexidine and amphotericin B on the mycotic flora. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 33, n. 1, p. 41-46, 1975.
81. PAKHOMOV, A.G. et al. Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 19, n. 7, p. 393-413, 1998.

Abstract

82. PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Estruturas das células procarióticas e eucarióticas. In: **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2^a.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. cap. 4, p. 100-143.
83. PENNOCK, C.A.; PASSANT, L.P.; BOLTON, F.G. Estimation of cerebrospinal fluid protein. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 21, n. 4, p. 518-520, July 1968.
84. PIRES, F.R. et al. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 1115-1159, Nov. 2002.
85. 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.
86. PONNE, C.T.; BARTELS, P.V. Interaction of electromagnetic energy with biological material-relation to food processing. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 45, p. 591-607, 1995.
87. 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.
88. ROHRER, M.D.; BULARD, R.A. Microwave sterilization. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 110, n. 2, p. 194-198, Feb. 1985.
89. ROHRER, M.D. et al. Microwave sterilization of hydrophilic contact lenses. **Am. J. Ophthalmol.**, Chicago, v. 101, n. 1, p. 49-57, Jan. 1986.
90. ROSASPINA, S. et al. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. **Microbios**, Cambridge, v. 78, n. 314, p. 55-59, Mar. 1994.
91. 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.
92. 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, p. 960-964, Oct. 1982.

Abstract

93. SESMA, N. et al. Eficiência de métodos caseiros de higienização de próteses parciais removíveis. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 53, n. 6, p. 463-468, nov./dez. 1999.
94. 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, set. 2004.
95. SOLL, D.R. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Trop.**, v. 81, n. 2, p. 101-110, Feb. 2002.
96. STROOP, W.G.; SCHAEFER, D.C. Comparative effect of microwaves and boiling on the denaturation of DNA. **Anal. Biochem.**, New York, v. 182, n. 2, p. 222-225, Nov. 1989.
97. TAJCHAKAVIT, S.; RAMASWAMY H.S.; FUSTIER, P. Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. **Food Res. Intern.**, Ottawa, v. 31, n. 10, p. 713-722, 1998.
98. TATA, A.; BEONE, F. Hospital waste sterilization: a technical and economic comparison between radiation and microwaves treatments. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 46, p. 1153-1157, 1995.
99. THOMAS, C.J.; WEBB, B.C. Microwaving of acrylic resin dentures. **Eur. J. Prosthodont. Rest. Dent.**, Larkfield, v. 3, n. 4, p. 179-182, June 1995.
100. VELA, G.R.; WU, J.F. Mechanism of lethal action of 2,450-MHz radiation on microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 3, p. 550-553, Mar. 1979.
101. VERSCHAEVE, L.; MAES, A. Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 410, n. 2, p. 141-165, Apr. 1998.
102. WATANABE, N. et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. **Clin. Chem.**, v. 32, n. 8, p. 1551-1554, Aug. 1986.

Abstract

103. WATANABE, K. et al. Effect of ionic strength on the inactivation of micro-organisms by microwave irradiation. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.31, n.1, p. 52-56, July 2000.
104. 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.
105. WILLIAMS, D.W. Strain persistence of invasive *Candida albicans* in chronic hyperplastic candidosis that underwent malignant change. **Gerodontology**, Basel, v. 18, n. 2, p. 73-78, Dec. 2001.
106. WILLIS, A.M. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 91, n. 3, p. 317-321, Mar. 2001.
107. WILSON, J. The etiology, diagnosis and management of denture stomatitis. **Br. Dent. J.**, London, v. 185, n. 8, p. 380-384, Oct. 1998.
108. WOO, I.; RHEE, I.; PARK, H. Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2243-2247, May 2000.
109. YEO, C.B.A. 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.
110. 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.

9 Apêndice

9.1 Apêndice A

Resultados de contagem celular

Tabela A1- Valores das médias das duplicatas de contagem de células de *C. albicans* íntegras e não-íntegras por mL

Repetição	Controle		Experimental	
	Íntegras	Não-íntegras	Íntegras	Não-íntegras
1	2,30E+08	-	-	2,67E+08
2	3,03E+08	-	-	2,75E+08
3	2,64E+08	-	-	4,37E+08
4	4,47E+08	-	-	4,10E+08
5	8,00E+08	-	-	7,90E+08
6	1,00E+08	-	-	3,36E+08
7	1,88E+08	-	-	1,47E+08
8	2,95E+08	-	-	3,04E+08

- = ausência de células contáveis


AbstractTabela A2- Valores das médias das duplicatas de da contagem de células viáveis (ufc/mL) de *C. albicans*

Repetição	Controle	Experimental
1	4,80E+08	-
2	2,44E+08	-
3	2,22E+08	-
4	2,92E+08	-
5	1,60E+08	-
6	2,00E+08	-
7	2,00E+08	-
8	5,40E+08	-

- = ausência de ufc



Abstract

9.2 Apêndice B

Resultados de liberação de substâncias intracelulares

Tabela B1– Valores originais em densidade óptica (DO) determinados pelo sistema Microprote

<i>Repetição</i>	Controle	Experimental
1	0,011	0,061
2	0,015	0,048
3	0,011	0,036
4	0,017	0,040
5	0,016	0,046
6	0,019	0,090
7	0,010	0,040
8	0,015	0,050
Padrão	0,144	


Abstract

Tabela B2– Valores originais em densidade óptica (DO) determinados pelo sistema Sensiprote

<i>Repetição</i>	Controle	Experimental
1	0,073	0,119
2	0,027	0,225
3	0,043	0,090
4	0,071	0,148
5	0,034	0,104
6	0,020	0,073
7	0,035	0,077
8	0,035	0,091
Padrão	0,347	


Abstract

CAMPANHA, N.H. **Efeito da irradiação com microondas sobre células de *Candida albicans***. 2005. 159 f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral – Prótese) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

Resumo

A irradiação com microondas tem sido recomendada para a desinfecção de próteses odontológicas de resinas acrílicas devido ao seu poder inibitório sobre os microrganismos. Entretanto, as alterações celulares provocadas pela irradiação e que levam à inativação dos microrganismos presentes nas próteses não estão esclarecidas. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos das microondas sobre células de *Candida albicans*, por meio de parâmetros de contagem celular e de liberação de substâncias intracelulares. Foram obtidas culturas de *C. albicans* de 24 horas em Tryptic Soy Broth (TSB) a partir de cepas padrão (ATCC 10231). 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 (200 mL) foi colocada em um béquer de 500 mL contendo uma prótese total acrílica estéril e irradiada por microondas durante 6 min 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, utilizando a entrada do corante azul de Metileno, como indicativo de alteração de permeabilidade de membrana. Alíquotas diluídas também foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD). Alíquotas não diluídas foram analisadas quanto à densidade óptica (DO) a 550 nm. Para a quantificação de substâncias liberadas, as células foram eliminadas das suspensões por centrifugação e filtragem e a solução resultante foi liofilizada. O conteúdo liofilizado foi ressuspense em 5 mL de água destilada e analisado pelos seguintes métodos: Microprote e Sensiprote, para quantificação de proteínas; potenciometria, para quantificação de Na^+ e K^+ ;

Abstract

Liquiform, para quantificação de Ca^{++} ; e DO a 260 nm para quantificação de ácidos nucléicos. Todos os testes foram realizados em duplicata e repetidos em 8 dias diferentes. Para a análise dos resultados, foi utilizado o teste *t* de Student ou *z* de Wilcoxon, ao nível de 5% de significância, comparando as médias de dados pareados. Não foram encontradas diferenças entre as suspensões experimental e controle, quando foram comparadas suas médias de DO a 550 nm ($P=0,272$). As células da suspensão controle apresentaram-se íntegras, enquanto que as da suspensão experimental não apresentaram integridade de membrana, de acordo com a entrada do azul de Metileno. Não foram encontradas ufc contáveis nas placas de ASD da suspensão experimental, enquanto que a suspensão controle apresentou contagens da ordem de 10^8 ufc/mL. A liberação de proteínas da suspensão experimental foi significativamente maior do que a da suspensão controle, tanto pelo sistema Microprote ($P<0,001$), quanto para o sistema Sensiprote ($P=0,005$). A liberação de K^+ , Ca^{++} e ácidos nucléicos da suspensão experimental foi significativamente maior do que a da suspensão controle ($P<0,001$, $P=0,012$ e $P=0,046$, respectivamente). Pela técnica de potenciometria, não foi detectada a presença de Na^+ em nenhuma das suspensões. De acordo com os resultados obtidos, e, dentro das condições experimentais do presente estudo, pode-se concluir que, para a maioria dos parâmetros utilizados, a suspensão experimental apresentou valores significativamente menores de contagem de células e maiores de substâncias liberadas. Entretanto, a irradiação não causou redução na densidade óptica das células em suspensão.

Palavras-chave: Microondas; *Candida albicans*.

CAMPANHA, N.H. **Effect of microwave irradiation on *Candida albicans* cell suspensions**. 2005. 159 f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral – Prótese) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

Abstract

Microwaves have been used in the disinfection of acrylic resin dentures as a result of its inhibitory effect on microorganisms. However, much controversy exists concerning the lethal effects of microwave radiation on microorganisms. Evaluating the presence of significant differences on cell counts and substances released between irradiated and non-irradiated *Candida albicans* cell suspensions was the aim of this study. A stock *C. albicans* strain (ATCC 10231) was cultured in 600 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) at 37°C on a rotating shaker. The cells were centrifuged, water-washed and resuspended in distilled cold water to a final concentration of 10^8 cell/mL. The cell suspensions were equally divided in a 200 mL experimental suspension, which was placed in a 500 mL beaker with an acrylic resin denture inside and irradiated for 6 min at 650 W. The control suspension (200 mL) was not submitted to irradiation. Aliquots of both suspensions were serially diluted and counting in a Neubauer chamber using the uptake of Methylene blue dye as indicative of alterations in membrane cell permeability. Serially diluted aliquots were spread on Agar Sabouraud dextrose (ASD) plates for viability assay. Non-diluted aliquots were spectrophotometrically measured at 550 nm. To quantify the intracellular released substances, the cells were separated from the suspensions by centrifugation followed by filtering, and the resulting solution was freeze-dried. This lyophilized was resuspended in 5 mL of cold water and submitted to optical density (OD) analyses of protein contents by the Microprote and Sensiprote systems; potentiometry analysis of Na^+ and K^+ contents; Ca^{++} contents analysis by



Abstract

Liquiform; and nucleic acids contents analysis by OD measurements at 260 nm. All experiments were carried out in duplicate and repeated eight times. Data were analyzed by the Student *t* or Wilcoxon *z* tests, at a 5% of level of significance, comparing coupling data of means. No significant reduction of cell optical density ($P=0,272$) was observed. All the control cells had a non-ruptured appearance while all the experimental cells seemed ruptured, as indicated by the uptake of Metylene blue dye. Viable *C. albicans* were not detectable in the irradiated cell suspensions ASD plates, while the survival of the control cells was 10^8 ufc/mL. The protein-released contents from the experimental suspensions were significantly higher than the control, as analyzed by the Microprote ($P<0.001$), and by the Sensiprote ($P=0.005$) systems. The release of K^+ , Ca^{++} and nucleic acids from the experimental suspensions was significantly higher than that from the control ($P<0.001$, $P=0.012$ and $P=0.046$, respectively), while the release of Na^+ from both suspensions was not detected. Within the limitations of this study, it was concluded that when 200 mL cell suspensions of *C. albicans* were irradiated with microwaves at 650 W for 6 minutes, cell membranes were damaged. Moreover, the microwave irradiation in *C. albicans* cell suspensions resulted in a complete reduction in the viable cell counts. It was observed more breakage of microwave treated cell suspensions than of control cell suspensions, as the microwave treated cells leached significant more amounts of protein, nucleic acids, K^+ and Ca^{++} . However, no significant reduction of cell optical density was observed in microwaved cell suspensions.

Keywords: Microwaves; *Candida albicans*.