

ANA PATRÍCIA FERNANDES DE MACÊDO

**EFEITO DA DESINFECÇÃO POR MICROONDAS EM
BIOFILMES
DE *CANDIDA* SP. FORMADOS EM RESINAS ACRÍLICAS**

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
da Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de mestre
em Clínica Odontológica -
Área de concentração Prótese Dental.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Leonardo Xediek Consani
Co-orientador: Profa. Dra. Janaína Sardi

PIRACICABA
2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

M151e	<p>Macêdo, Ana Patrícia Fernandes de. Efeito da desinfecção por microondas em biofilmes de <i>Candida</i> sp. formados em resinas acrílicas / Ana Patrícia Fernandes de Macêdo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Rafael Leonardo Xediek Consani. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Prótese total. 2. Estomatite. 3. <i>Candida albicans</i>. I. Consani, Rafael Leonardo Xediek. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(eras/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Effects of microwave disinfection in biofilms of *Candida* sp. formed on acrylic resins

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Denture, Complete. 2. Stomatitis. 3. *Candida albicans*

Área de Concentração: Prótese Dental

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Rafael Leonardo Xediek Consani, Francisco de Assis Mollo Júnior, Marcelo Ferraz Mesquita

Data da Defesa: 10-02-2011

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 10 de Fevereiro de 2011, considerou a candidata ANA PATRÍCIA FERNANDES DE MACÊDO aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rafael L. X. Consani".

Prof. Dr. RAFAEL LEONARDO XEDIEK CONSANI

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisco de Assis Mollo Júnior".

Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS MOLLO JÚNIOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marcelo Ferraz Mesquita".

Prof. Dr. MARCELO FERRAZ MESQUITA

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe e amiga, **Fátima**, pelo incentivo, apoio e confiança incondicionais, que me fazem seguir este caminho longe de casa com coragem e determinação, e por estar sempre presente, em todos os momentos de minha vida.

*“Minha primeira lágrima caiu dentro dos teus olhos
Tive medo de a enxugar: para não saberes que havia caído.”*

Cecília Meireles

Ao meu querido e amado pai, **Fernando**, pela intensa dedicação, pelo amor incondicional que contribuem para minha formação e me dão forças para sempre seguir em frente.

*“... Como um brilhante que partindo a luz explode em sete cores, revelando,
então, os sete mil amores, que eu guardei somente pra te dar...”*

Tom Jobim

Ao meu querido irmão, **Nandinho**, que sempre esteve comigo, apoiando e engrandecendo a minha caminhada.

*“Esse imenso desmedido amor vai além de seja o que for
Vai além de onde eu vou, do que sou...”*

Caetano Veloso e Djavan

Aos meus amados avôs, **Wilson e Egle, Macêdo e Nitônia** pelo lindo exemplo de vida, apoio, confiança e amor incondicionais.

“Os sonhos mais lindos, sonhei... de quimeras mil um castelo ergui...”

Marchetti e Armando Louzada

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao meu amor, amigo e companheiro de todas as horas, **Raphael...**

“O que será que me dá...

Que brota a flor da pele, será que me dá...

O que me sobe as faces e me faz corar...

E que me aperta o peito e me faz confessar...

O que não tem mais jeito de dissimular...

O que será que será...”

“A penas seguirei...,

... como encantada... ao lado teu...”

Chico Buarque

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rafael Leonardo Xediek Consani**, Adjunto da área Prótese Total do Departamento de Prótese e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelos ensinamentos, confiança em meu trabalho, paciência e companheirismo durante minha caminhada, todo meu agradecimento, respeito e admiração.

À querida **Profa. Dra. Janaína Sardi**, pós-doutoranda do Departamento de Análises Clínicas da Área de Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia, UNESP – Araraquara, sem os seus ensinamentos, dedicação e carinho seria impossível a realização deste trabalho. Terá sempre minha gratidão...

Aos **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves e Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner**, do Departamento de Diagnóstico Oral, Área de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela autorização do uso do Laboratório de Microbiologia e Imunologia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus** que sempre me abençoa, ilumina e conduz em todos os momentos da minha vida.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior** e Diretor Associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora dos Programas de Pós-graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela condução dos trabalhos.

Ao **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**, Titular da área Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, sem o seu empenho e auxílio na elaboração da análise estatística não seria possível concluir este trabalho.

Aos Professores, **Dr. Marcelo Ferraz Mesquita**, **Dr. Mauro de Arruda Nóbilo** e **Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques** das Áreas de Prótese Total e Prótese Fixa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pelos exemplos, ensinamentos e convívio harmônico.

Aos demais **Docentes** do Departamento de Prótese e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

À minha querida **Profa. Dra. Adriana Carreiro**, docente do Departamento de Odontologia da UFRN, pela amizade, conselhos, ensinamentos, contribuindo para meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional.

À empresa **ACECIL e Dr. Manoel Marcos Quattrer** pela gentileza e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Prótese e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, em especial a **Eliete, Eduardo e Mônica**, pelo convívio agradável e disposição em sempre me ajudar.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação, em especial **Manoela, Jéssica, Maíra, Bruna, Gabriela, Ana Paula, Juliana, Leo, Matheus, Athaís, Iza, Carol, Mari, Sabrina, João Paulo**, pelo companheirismo, ajuda e apoio em todos os momentos importantes.

Às minhas queridas e amadas amigas, **Lília, Isabel, Priscilla, Andressa, Juliana, Marina, Izadora, Leila e Raphaela** por compreenderem a minha ausência e torcerem pelo meu sucesso.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”.

(Sócrates)

RESUMO

O objetivo neste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito da desinfecção por microondas em biofilmes de *Candida* sp formados em resinas acrílicas Clássico, Onda-Cryl e QC-20. Para isso foram confeccionados 30 corpos-de-prova (20mm de diâmetro por 2mm de altura), de cada resina, esterilizados com óxido de etileno. Após a obtenção do inóculo da levedura (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*), os corpos-de-prova foram contaminados individualmente com 200 µL de uma cultura ajustada a 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os espécimes foram colocados em meio de cultura específicos e incubados por 24 horas a 37°C em aerobiose para a formação do biofilme. Para cada resina e cada microorganismo avaliados, 03 corpos-de-prova foram irradiados por microondas com potência de 650 W durante 3 minutos, 01 corpo-de-prova controle não foi irradiado e outro corpo-de-prova controle sem microorganismos. Após esse processo, os corpos-de-prova foram lavados em solução salina e plaqueados em meio de cultura (Sabouraud dextrose Ágar) para análise do número de UFC/mL. Para análise estatística foi empregado o método de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. O grupo controle (não irradiados) apresentou crescimento microbiano após 48 horas de incubação a 37°C. O grupo experimental apresentou diminuição significativa no número de colônias viáveis para todos os biofilmes formados pelas espécies de *Candida* analisadas. Os resultados demonstraram efetiva esterilização do biofilme de *Candida* após irradiação a 650 W por 3 minutos, para a maioria dos corpos-de-prova. O procedimento demonstrou ser um método capaz de diminuir consideravelmente a quantidade destes microrganismos.

Palavras chave: biofilme, resina acrílica, desinfecção, microondas, *Candida* sp.

ABSTRACT

The objective of this *in vitro* study was to evaluate the effect of microwave disinfection in biofilms of *Candida sp.* immersed in acrylic resin specimens (Clássico, Onda-Cryl and QC-20). For the study, 30 specimens (20mm X 2mm) were fabricated, for each resin, and subjected to ethylene oxide sterilization. After obtaining the inoculum of yeast (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis*), the specimens were infected individually with 200µL of a culture adjusted to 10^8 CFU / mL, placed in specific media and incubated for 24 hours to 37°C aerobically for biofilm formation. For each resin and microorganism, 03 specimens were irradiated by microwave for 3 minutes at 650 W, and a control non-irradiated and a control without microorganisms. After this process, the specimens were washed with saline and then plated in Sabouraud dextrose agar for analysis of the number of colony forming units (CFU / mL). For statistical analysis was used the method of Kruskal-Wallis test followed by Student-Newman-Keuls. The control group (not irradiated) showed microbial growth after 48 hours incubation at 37°C. The experimental group showed a significant decrease in the number of viable colonies for all the biofilms formed by *Candida* species analyzed. Thus, the results demonstrated an effective sterilization of *Candida* biofilm after 3 minutes of irradiation at 650W for most of the specimens. The procedure proved to be able to significantly decrease the amount of microorganisms.

Keywords: biofilm, acrylic resin, disinfection, microwave, *Candida sp.*

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO DA LITERATURA	5
3-PROPOSIÇÃO	46
4-MATERIAIS E MÉTODO	47
4.1-Obtenção dos corpos-de-prova	47
4.2-Esterilização dos corpos-de-prova	51
4.3-Obtenção do inóculo para contaminação dos corpos-de-prova	52
4.3.1-Amostras de levedura	52
4.3.2-Formação do biofilme	54
4.4-Descontaminação e desinfecção dos corpos-de-prova	56
4.5-Contagem dos microorganismos	57
4.6-Planejamento estatístico	58
5-RESULTADOS	60
6-DISCUSSÃO	61
7-CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

1-INTRODUÇÃO

O controle da infecção na Odontologia tem se tornado alvo de discussões em virtude do crescimento dos casos de hepatite B e AIDS em todo o mundo (Budtz-Jørgensen *et al.*, 1990; Asad *et al.*, 1993; Tony *et al.*, 1997). O uso de próteses total ou parcial removíveis desadaptadas e mal higienizadas pode induzir alterações na mucosa subjacente que as suportam, entre elas, a estomatite protética (Newton, 1962; Love *et al.*, 1967; Davenport, 1970). Essas alterações são caracterizadas por inflamação moderada ou intensa encontradas sob próteses, podendo ocorrer na maxila e mandíbula; porém, com mais freqüência na maxila (Newton, 1962; Love *et al.*, 1967; Davenport, 1970).

A estomatite protética é a forma mais freqüente de infecção por *Candida sp.* e tem sido encontrada em até 60% dos portadores de prótese total (Ritchie *et al.*, 1969; Davenport, 1970; Iacopino & Wathen, 1992). Quando a ocorrência de estomatite por prótese está associada à candidose, a resina acrílica da base torna-se um reservatório para espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*) (Davenport, 1970; Iacopino & Wathen, 1992; Olsen & Stenderup, 1990; Nikawa *et al.*, 1997).

Estudos têm mostrado que as espécies de *Candida* são comumente encontradas nas próteses (Tony *et al.*, 1997; Novais *et al.*, 2009). Esses patógenos são oportunistas, portanto, deve-se suspeitar de algum comprometimento sistêmico (infecção por HIV, síndrome de Sjögren, diabetes, hipotireoidismo, etc) em pacientes infectados por *Candida sp* (Budtz-Jørgensen *et al.*, 1990; Wilson, 1998). A candidose bucal relacionada à utilização de próteses removíveis, parciais ou totais é denominada estomatite protética e caracteriza-se pela presença de área eritematosa na mucosa em contato com a prótese (Tony *et al.*, 1997; Pires *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002). Nas estomatites presentes no meio bucal, a *Candida albicans* é prevalente; porém, existem relatos que foram encontradas outras espécies de *Candida* (Tony *et al.*, 1997; Pires *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002).

O diagnóstico da infecção fúngica pode ser feito pelo dentista por meio de sinais e sintomas clínicos ou por exames microbiológicos específicos

como saliva, esfregaços, amostras histológicas, cromatografia, entre outros (Newton, 1962; Davenport, 1970; Abelson, 1981).

São necessárias algumas condições ambientais para que os microorganismos do gênero *Candida*, ao invadir os tecidos, se comportarem como patógenos oportunistas, considerando que as espécies de *Candida albicans* habitam o organismo de indivíduos saudáveis, como comensais (Love *et al.*, 1967; Budtz-Jørgensen *et al.*, 1990; Budtz-Jørgensen, 1990; Wilson, 1998). A adesão de *Candida* às superfícies mucosas está relacionada à virulência dos microorganismos, características químicas e estruturais da parede celular, bem como das moléculas de aderência (Love *et al.*, 1967). Este tipo de fungo possui capacidade de dimorfismo, ou seja, altera sua morfologia comensal para formas patogênicas.

Na forma comensal, as células de *Candida* spp. são leveduriformes (blastoporos), unicelulares e frequentemente esporuladas (Olsen, 1965). Porém, quando inicia o processo infeccioso, esses patógenos deixam de ser leveduriformes e passam à forma micelial, que são estruturas multicelulares alongadas, em forma de tubo, chamadas pseudohifas (não septadas) ou hifas (septadas). As leveduriformes são facilmente encontradas nas infecções por *Candida* spp. As formas miceliais são difíceis de serem fagocitadas pelos macrófagos dos hospedeiros, favorecendo sua penetração nos tecidos (Olsen, 1965).

Existem alguns fatores que predispõe o surgimento da Candidose bucal, como distúrbios metabólicos, idade, outras desordens mucosas, terapias com antibióticos, imunossupressão; além de fatores locais como xerostomia e desadaptação da base da prótese total (Love *et al.*, 1967; Budtz-Jørgensen *et al.*, 1990; Budtz-Jørgensen, 1990; Tony *et al.*, 1997; Wilson, 1998; Pires *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002). A infecção aguda por *Candida albicans* em pacientes livres de fatores predisponentes é mais bem controlada (Fotos *et al.*, 1992; Chandra *et al.*, 2001; Crocco *et al.*, 2004). Em pacientes portadores de próteses totais ou removíveis, a *Candida albicans* pode ser eliminada por meio da remoção das próteses com maior frequência, juntamente com a eficiente desinfecção das mesmas (Love *et al.*, 1967).

Estudos mostram que existe maior concentração de *Candida* sp. nas bases das próteses totais que na mucosa de indivíduos portadores de

estomatites, o que mostra que o tratamento da desordem deveria estar associado à desinfecção da resina acrílica (Davenport, 1970; Pires *et al.*, 2002).

A desinfecção é a destruição da maioria dos microorganismos, mas não necessariamente todos, enquanto esterilização é a completa destruição de todos os microorganismos, independente da resistência (Molinari & Runnels, 1991). No caso da desinfecção das próteses dentárias, a inativação dos microorganismos presentes na superfície e nos poros das próteses é fundamental para que haja efetivo controle da infecção cruzada entre pacientes, cirurgiões-dentistas e técnicos de laboratório (Abelson, 1981; Brace & Plummer, 1993; Lombardi & Budtz-Jørgensen, 1993). Da mesma forma, após os procedimentos laboratoriais, os técnicos de laboratório devem realizar outra desinfecção das próteses, considerando que estas podem ter sido contaminadas durante os procedimentos de acabamento e polimento (Lombardi & Budtz-Jørgensen, 1993).

A terapia antifúngica tópica não elimina completamente os microorganismos, apesar de serem eficazes no alívio de sinais e sintomas (Abelson, 1981; Wanke *et al.*, 2000). A terapia antifúngica sistêmica só é recomendada quando o paciente apresenta imunossupressão (Ritchie *et al.*, 1969; Requa-Clark, 1983; Molinari & Runnels, 1991). São utilizados de forma tópica os agentes do grupo dos polienos, como anfotericina B, nistatina. A resistência da espécie *C.albicans* é considerada como principal falha no tratamento tópico, o que proporciona a incidência de espécies menos susceptíveis como *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Crocco *et al.*, 2004; Sanitá *et al.*, 2009).

A relação entre as estomatites presentes no meio bucal e a limpeza das próteses deve ser enfatizada (Requa-Clark, 1983; Molinari & Runnels, 1991; Pavarina *et al.*, 2003). O uso de agentes desinfetantes, nas mais variadas formas, permite o controle da infecção. Alguns estudos recentes demonstram o uso do ultra-som na limpeza de próteses totais, com maior eficácia na remoção de cálculos e pigmentações (Abelson, 1981).

Os métodos de desinfecção utilizados pelos usuários das peças protéticas ou pelos profissionais da Odontologia são diversos, como lavar em água, escovar com dentífrico, imersão em soluções químicas (Ritchie *et al.*,

1969; Requa-Clark, 1983; Molinari & Runnells, 1991). Porém, tais métodos podem trazer efeitos indesejados, como alteração da resina acrílica pelas pastas e pós que podem ser abrasivos, assim como a imersão em hipoclorito pode manchar as próteses parciais removíveis (Requa-Clark, 1983).

A utilização das microondas como método de desinfecção das próteses ainda é restrita, apesar de ser uma alternativa viável ao emprego da imersão em soluções químicas (Compagnoni *et al.*, 1993; Novais *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009). A irradiação por microondas tem sido utilizada para a desinfecção de vários segmentos como lentes de contato, alimentos e instrumentais médicos (Webb *et al.*, 1998; Border & Rice-Sperman, 1999; Crocco *et al.*, 2004). Os autores têm sugerido o umedecimento dos materiais durante a radiação, com o objetivo de obter maior efetividade na desinfecção (Tony *et al.*, 1997; Pavarina *et al.*, 2003). A potência de 650 W e exposição de 3 minutos têm sido relatadas na literatura como suficiente para a desinfecção de bases acrílicas e próteses totais com o auxílio de microondas (Dixon *et al.*, 1999; Pavarina *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006; Mima *et al.*, 2007). Esse método de desinfecção tem demonstrado preservar as propriedades mecânicas de resinas acrílicas (Campanha *et al.*, 2005).

Com base nas considerações apresentadas, seria interessante verificar o efeito da desinfecção por microondas em biofilmes de *Candida sp.* (*albicans*, *dubliniensis* e *tropicalis*) formados na superfície de três resinas acrílicas, polimerizadas através de ciclo térmico longo, microondas e água em ebulição.

2- REVISÃO DA LITERATURA

Em 1962, Newton realizou uma revisão de literatura na tentativa de relacionar os fatores etiológicos responsáveis pelas mudanças patológicas observadas na mucosa oral de pacientes portadores de próteses totais. Ele observou que tais mudanças estão mais comumente relacionadas à má adaptação dessas próteses. Os sinais clínicos podem ser divididos em três estágios: *hiperemia pin-point* – pequenas áreas inflamatórias localizadas ao redor de orifícios de glândulas da mucosa do palato; *hiperemia difusa* – inflamação generalizada em toda a superfície de mucosa em contato com a dentadura e *granular* – a mucosa oral apresenta uma superfície com hiperemia nodular, mais comum no centro do palato em contato com a base da prótese. O estudo aponta como possíveis fatores etiológicos de o trauma, pouca secreção salivar, estomatite por nicotina e alergia.

Em 1965, Olsen investigou a utilização da energia de microondas com o objetivo de reduzir a quantidade de fungos no pão. Os esporos de três fungos comumente encontrados nesse tipo de alimento (*Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. e *Rhizopus nigricans*) foram cultivados em tubos contendo ágar 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 a 5.000 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 os números de esporos viáveis e de colônias dos três fungos avaliados foram significativamente reduzidos após a irradiação por 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 pão reterem a temperatura atingida por tempo maior 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 poderiam representar alvo preferencial para a energia de microondas, o que leva a temperatura interna desses microorganismos a exceder o suficiente para promover lise ou inativação.

Love *et al.*, em 1967, realizaram um estudo com o objetivo de elucidar as causas da inflamação na mucosa bucal associada ao uso de próteses totais. Para isso, 522 pacientes portadores de próteses totais se submeteram aos questionários que investigaram a idade, tipo de prótese total, tempo de confecção da prótese, experiência com próteses totais, hábitos de higiene bucal e condição do suporte mucoso. Os autores concluíram que o tipo de ajuste da prótese total teve mais influência na condição do suporte mucoso do que outros fatores analisados no estudo, o que ressalta a importância das sessões de ajuste clínico e controle após a instalação da prótese; a remoção noturna da prótese total reduz drasticamente a incidência de inflamação; os pacientes mais jovens apresentaram menor ocorrência de patologias na mucosa bucal. O estudo evidenciou ainda que a etiologia da inflamação associada a próteses totais removíveis é complexa e que estudos que mostrem tratamentos efetivos e procedimentos preventivos ainda são necessários para tratar tal condição.

O objetivo principal do trabalho de Ritchie *et al.*, em 1969, foi investigar os possíveis fatores etiológicos e a efetividade do tratamento das estomatites em pacientes portadores de próteses totais. Tal condição patológica também pode ser chamada de candidíase crônica atrófica ou apenas candidose. Os autores examinaram 100 pacientes usuários de próteses

e com sintomas de estomatite, dentre os quais 71 do sexo feminino e 29 do sexo masculino. Foi realizado um exame detalhado sobre a condição geral das próteses totais, seu tempo de uso, o protocolo de higiene dos voluntários e a história médica pregressa. Os pacientes foram, então, graduados de acordo com a classificação de Newton para estomatites em próteses totais. As próteses foram examinadas desde a primeira visita até as subseqüentes para possíveis fatores traumáticos. Testes no sangue e de alergia foram realizados naqueles pacientes que não responderam bem ao tratamento. Os autores apontam como principais fatores etiológicos: trauma, infecção bacteriana, alergia, deficiências nutricionais, deficiências hormonais, antibióticos orais. Em 93% dos pacientes foram encontrados fatores traumáticos de magnitude suficiente para causar hiperemia primária, além disso, 74% dos pacientes admitiram usar as próteses durante a noite. Material de cultura de 60 pacientes foi obtido através de *swabs* e esfregaços do palato, indicando a presença de *Candida Albicans*. A literatura médica aponta como causa freqüente de estomatites em próteses totais a alergia a resina acrílica, porém, esta condição é rara. O uso de antibióticos orais como causa de estomatites é verificado em 23% dos pacientes que apresentam candidose oral. Todos os pacientes receberam tratamento protético em algum estágio do estudo, sendo que 40 pacientes foram tratados apenas com a confecção de novas próteses (a estomatite foi eliminada em 29 pacientes); 53 pacientes receberam novas próteses e administração de droga com dose única. A nistatina foi utilizada em 17 pacientes, anfotericina B em 17 pacientes e Remiderm em 19 pacientes. Foram tratados com uma combinação de terapia 17 pacientes. Os autores concluíram que o mais comum fator etiológico da patologia são o trauma e a presença de *Candida Albicans*; a nistatina é a droga mais efetiva no tratamento e sua forma em creme parece ser menos ofensiva; porém a anfotericina B é satisfatória para a maioria dos pacientes e é mais agradável que a nistatina.

Um estudo realizado por Davenport, em 1970, utilizou esfregaços colhidos da superfície interna de bases de próteses totais assim como da mucosa do palato de 50 pacientes com estomatite protética; para o grupo controle foram selecionados outros 50 pacientes usuários de próteses totais com ausência de sinais inflamatórios. O autor teve como objetivo avaliar a

distribuição e proliferação de *Candida*, sendo observada maior quantidade deste microorganismo nos esfregaços colhidos das próteses totais, em detrimento aqueles colhidos da mucosa do palato, fato comprovado pelo autor através de biópsia realizada na mucosa do palato. O estudo concluiu que a estomatite em prótese total está associada com a proliferação de *Candida*, primeiramente na base da prótese e posterior inflamação da mucosa do palato, fato que sugere o tratamento para tal patologia baseado na redução do fungo na base da prótese total ao invés de seu combate primário na mucosa inflamada.

Em 1979, Arendorf ressaltou a relevância do uso adequado das próteses totais para a compreensão das estomatites protéticas provocada por *Candida*, pois o uso incorreto de dentaduras altera a população desses microorganismos em bocas saudáveis. O autor teve como objetivo avaliar se a população de candidíase oral em pacientes usuários de próteses totais e aqueles com a boca saudável diferiam significativamente dos indivíduos dentados. Os pacientes foram avaliados através de questionários, exame oral, amostra de saliva, meios de cultura e esfregaço epitelial. Os resultados mostraram uma significativa presença de estomatite protética por *Candida* nos pacientes que permaneciam usando a dentadura durante a noite. Além disso, a presença do microorganismo foi encontrada em maior quantidade nos pacientes usuários de dentaduras, quando comparados aos pacientes dentados. O autor concluiu que a prática de não retirar a prótese total durante a noite favorece ao aparecimento de candidíase oral; além disso, os achados desses autores sugerem que outras formas *Candida* podem estar associadas à estomatite protética.

Em 1981, Abelson avaliou a placa presente nas dentaduras e o modo efetivo de limpeza das mesmas. Segundo o autor, a literatura a respeito da relação entre placa bacteriana, patologia oral e efetividade dos produtos comercializados para higienização deve ser revisada. Estudos apontam que a placa presente na superfície das bases das próteses é o maior fator etiológico na patogênese da estomatite protética, hiperplasia papilar inflamatória e candidíase crônica. O estudo descreve a efetividade na remoção de placa

bacteriana através da utilização do ultra-som com água e o peróxido alcalino (Efferdent e Polident). Foram utilizadas dentaduras de 18 voluntários, as quais não passaram por nenhum processo de higienização durante 03 dias. Após submeter próteses à limpeza com ultra-som e com peróxido alcalino, o autor concluiu que o teste associando ultra-som e água demonstrou uma melhor efetividade quando comparado a higienização com peróxido alcalino.

Numa revisão da literatura realizada em 1983, Requa-Clark avaliou os materiais e métodos utilizados na higiene de próteses totais. Até aquele momento, os usuários de dentaduras utilizavam a imersão em água, substâncias de auto-limpeza e escovação com dentífrico. Os produtos disponíveis no mercado são pastas abrasivas de consistência leve; agentes oxidantes como o hipoclorito, peróxidos e persulfatos; ácidos minerais e enzimas. O estudo aponta que testar a eficácia destes materiais tem sido complicado e os resultados presentes na literatura são dependentes das condições nas quais as pesquisas são realizadas. Em contrapartida, os estudos realizados pelos fabricantes não trazem a efetividade antimicrobiana dessas substâncias. As mais diferentes substâncias utilizadas na higienização das próteses produzem diferentes reações adversas nos materiais dentários; tais efeitos são sentidos principalmente pela resina acrílica das bases das dentaduras que podem apresentar mudança na coloração, na rugosidade superficial e até perda de resiliência. O autor aponta que embora a fórmula da maioria das substâncias usadas na higienização das próteses apresente pH neutro e não seja irritante, a ingestão acidental desses produtos podem causar queimaduras. Riscos similares existem também no caso das próteses não serem devidamente lavadas após imersão. Tais queimaduras podem resultar da elevada alcalinidade de alguns produtos de limpeza, sendo comuns irritações nos olhos, na pele. O autor concluiu que tanto os dentistas quanto os usuários de dentaduras deveriam ter conhecimento suficiente sobre o uso desses solventes. E ainda, as embalagens deveriam incluir etiquetas de advertência sobre os perigos da ingestão.

O estudo realizado por Roher & Bulard, em 1985, teve como objetivo avaliar a efetividade das microondas na redução da infecção cruzada entre consultório odontológico e laboratório de prótese. Os autores realizaram as experiências com os microorganismos inoculados em tubos de ensaio contendo meio de Brain-(Heart Infusion), próteses com metal ou totalmente em resina acrílica, brocas metálicas e peças de mão. Os corpos-de-prova foram contaminados com 10⁵ org/mL de cada um dos seguintes microorganismos: três tipos de bactérias não esporuladas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*), uma bactéria aeróbica esporulada (*B. subtilis*), uma bactéria esporulada anaeróbica (*C. histolyticum*), um fungo (*C. albicans*) e dois vírus (polio tipo 1 e herpes simplex tipo 1). Os corpos-de-prova foram ou não fixados a um dispositivo rotacional tridimensional desenvolvido pelos autores, para a utilização no forno de microondas. Os corpos-de-prova contaminados foram submetidos às microondas a uma potência de 720 Watts, nos tempos experimentais de 0, 1, 3, 5, 8 e 10 minutos, e incubados a 37°C. A bactéria *B. subtilis* foi também inoculada em tiras de papel irradiadas por 20 minutos. O crescimento dos microrganismos foi avaliado para todos os materiais após 24 e 48 horas pela análise da turvação do meio e crescimento de colônias em placas de Petri. Para a irradiação das próteses, duas condições foram avaliadas para os testes de estabilidade dimensional: as próteses foram mantidas por 15 minutos em água ou foram mantidas a seco, antes de serem irradiadas. Para os autores, os resultados obtidos quando o dispositivo rotacional tridimensional foi utilizado evidenciaram maior efetividade no tratamento com microondas. Os tubos de ensaio contaminados com a mistura de quatro bactérias aeróbicas e *C. albicans* não demonstraram crescimento após 10 minutos de irradiação. A esterilização da bactéria esporulada anaeróbica *C. histolyticum* ocorreu após 3 minutos de irradiação. As tiras de papel com a bactéria esporulada aeróbica *B. subtilis* demonstraram esterilização apenas após 15 minutos de irradiação. As 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. Os autores não observaram 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 uma esterilização efetiva de materiais odontológicos, os autores sugeriram a irradiação por microondas associada à utilização do dispositivo tridimensional desenvolvido nesse estudo.

Em 1988, Budtz-Jørgensen *et al.* realizaram um ensaio duplo-cego para estudar o efeito da administração oral de fluconazol no tratamento da *Candida* associada à estomatite protética. O grupo de estudo consistiu de 38 pacientes com estomatite protética, que abrigava leveduras, principalmente *Candida spp*, em números significativos, conforme determinado pela cultura das lesões. Metade dos pacientes recebeu 50 mg de fluconazol ao dia, por via oral, durante 14 dias e a outra metade recebeu cápsulas de placebo. Foram estudados os seguintes parâmetros: grau de eritema do palato, presença de células de levedura (por germes e microscopia de varredura), identificação do nível de espécies de microrganismos dominantes, biótipo de *Candida albicans*, tratamentos e efeitos colaterais relacionados. O estudo constatou significativa redução no eritema posteriormente ao tratamento com fluconazol, mas a inflamação mostrou recidiva parcial em 2 a 4 semanas após a finalização do tratamento. Redução da dor na mucosa oral foi relatada por seis dos pacientes no grupo do fluconazol. Alterações clínicas não significativas da flora ou leveduras foram observadas no grupo placebo, tanto em quantidade e composição das espécies de leveduras, em cepas *C.albicans*, o que talvez indique diferenças entre patogenicidade e susceptibilidade do fluconazol entre diferentes espécies de leveduras e *Candida albicans*. O fluconazol não apresentou qualquer alteração nos resultados das análises de sangue e urina. Tais resultados indicam que o fluconazol é uma forma segura e bem tolerada de droga antimicótica. Os autores concluíram que o efeito clínico transitório e o antimicótico podem ter sido em parte devido às concentrações terapêuticas do fármaco não alcançadas sob a superfície e na base interna da dentadura.

Numa revisão da literatura realizada em 1990, Budtz-Jørgensen estudou a etiologia, patogênese, terapia e profilaxia das infecções orais por leveduras. O autor relatou que os fatores etiológicos da candidose oral são a imaturidade do sistema de defesa antimicrobiana do hospedeiro, a supressão imunológica (AIDS, imunodepressão ou radioterapia) ou as mudanças nas condições ambientais da cavidade oral (antibióticos, dentaduras, as alterações epiteliais). Após a colonização e aderência de *Candida*, a superfície epitelial da mucosa lesionada se deve à destruição do tecido por enzimas proteolíticas ou potentes toxinas e uma resposta inflamatória aos antígenos de *Candida*. O tratamento tópico com nistatina, anfotericina B ou miconazol é especialmente importante para evitar a propagação do microorganismo. Na colonização da estomatite protética, a superfície interna da prótese deve ser controlada, por exemplo, utilizando solução de clorexidina como desinfetante. No entanto, é freqüente a recorrência local ou sistêmica com o uso de tais substâncias. O autor concluiu que a candidose é a infecção micótica mais freqüente da cavidade bucal. Como os organismos *Candida* são comensais e constitui uma parte da flora bucal normal, os motivos da infecção são fatores desencadeantes, tais como imunodepressão do hospedeiro, distúrbios endócrinos, lesões na mucosa em contato com dentaduras, pobre higiene oral e o uso prolongado de antibióticos, corticosteróides e antineoplásicos, refletem na diversidade das condições predisponentes. Muitos tipos de candidose oral são tratados a partir da aplicação tópica de nistatina, anfotericina B e miconazol. Nos casos nodulares crônicos, o tratamento em longo prazo é recomendado. Em estomatites protéticas associadas à *Candida* o tratamento envolve criteriosa higiene das próteses, não utilizar a dentadura durante a noite, imersão em clorexidina e terapia antifúngica. Deve-se reconhecer que a recorrência da infecção é freqüente caso as condições predisponentes não forem corrigidas.

A histologia, imunologia e sorologia das infecções orais por levedura foram discutidas por Budtz-Jørgensen, em 1990, por meio de uma revisão da literatura. Segundo o autor, no diagnóstico, normalmente são obtidos espécimes para biópsia, já que um esfregaço bucal da lesão contém blastoporos e pseudohifas em abundância. No entanto, em lesões que

respondem mal ao tratamento antimicótico, uma biópsia deve ser realizada para detectar possíveis alterações malignas no epitélio. A avaliação da imunidade mediada por células contra a *Candida albicans* e outros antígenos pode ser importante em pacientes com candidose crônica severa para avaliar o grau de imunocompetência, assim como o prognóstico. Normalmente, os pacientes com candidose oral apresentam graus moderadamente elevados de anticorpos no soro e saliva contra *C.albicans* e testes sorológicos não são normalmente ferramentas de diagnóstico de candidose oral. No entanto, tais testes podem servir de instrumento prognóstico em pacientes com candidose oral grave que respondem mal à terapia antimicótica. O autor concluiu que culturas semi-quantitativas e esfregaços orais são as ferramentas mais importantes no diagnóstico de candidose oral. Um exame microscópico de cortes de tecido indicou alterações pré-malignas e malignas do epitélio associadas à infecção por *Candida*. Candidose oral é frequentemente associada a uma supressão da resposta das células T a *Candida* e outros antígenos *in vitro* e *in vivo*. A função deficiente das células T pode ser a condição direta predisponente para a infecção. Deve-se reconhecer, entretanto, que a redução na resposta de células T dos linfócitos sanguíneos contra *C.albicans* pode ser induzida por uma infecção crônica, a qual pode ser reversível com terapia antifúngica. Aquela que não pode ser suprimida reflete uma função das células T nos tecidos. Testes sorológicos não são ferramentas de diagnóstico de candidose oral, podendo ser úteis apenas para avaliar a gravidade da infecção.

Em estudo realizado através de relatos da literatura a respeito do diagnóstico clínico micológico de infecções orais fúngicas, Olsen e Stenderup, em 1990, observaram que espécimes orais convencionais para a identificação de leveduras são realizados através de *swabs* e esfregaços. Leveduras crescem bem em temperatura ambiente e podem se multiplicar em espécimes durante o transporte. Esfregaços diretos examinados através de blastoporos, hifas e células inflamatórias asseguram um diagnóstico presuntivo rápido. Identificação fúngica exige cultura, de preferência em diferentes suportes e em diferentes temperaturas para garantir o reconhecimento de todas as espécies presentes. YM ágar suplementado com 0,01% da anilina, possibilita a detecção

de *Candida albicans* e *C. parapsilosis* em placas primárias através de fluorescência. Exames histológicos para identificação de leveduras requerem o uso de ácido periódico de Schiff e Gridley. A coloração para fungos, assim como em casos de micoses orais raras, permite um diagnóstico pouco específico. Através da fluorescência da mancha se permite um diagnóstico micológico mais preciso num prazo de até 30 minutos. Os autores concluíram que resultados micológicos devem ser interpretados em conjunto com achados clínicos. Pacientes com estomatite protética induzida por *Candida* devem ter sua mucosa oral e o lado interno da prótese submetido a esfregaços com swabs. Serão encontradas quantidades abundantes de hifas, blastosporos e células inflamatórias nos esfregaços do palato e base da prótese total. Biópsias são impróprias para estomatite protética, considerando que normalmente o tecido afetado não é invadido por leveduras. Esfregaços e manchas umedecidas com água esterilizada ou soro fisiológico devem ser descartados.

Em um trabalho publicado em 1991, Molinari e Runnells relataram que o Conselho da ADA na terapia dental reconhece diversos produtos comerciais eficazes para uso pelos dentistas como desinfetantes ou esterilizantes. O controle de infecção tem facilidades no tratamento odontológico ao exigir o uso de desinfetantes sob diversas formas: desinfetantes de superfície, esterilizantes de imersão e desinfetantes antimicrobianos de mão. Diversos compostos comerciais de desinfetantes foram criados a partir de diversas categorias de compostos químicos genéricos e podem ser usados no tratamento de cuidados com a saúde, incluindo iodóforos, glutaraldeídos, compostos fenólicos e a base de cloro. Os autores definem desinfecção como a destruição da maioria dos microorganismos, mas não necessariamente todos, particularmente aqueles altamente resistentes a esporos microbianos. Ao passo que esterilização é a destruição completa de todos os microorganismos, independentemente da sua resistência. Desinfetantes químicos não são eficazes contra grande resistência das formas microbianas, como esporos bacterianos e micóticos. O uso de desinfetantes constitui um compromisso elaborado a partir das diretrizes gerais aceitas: um desinfetante não deve ser utilizado quando o agente de esterilização necessita ser utilizado. Alguns dos produtos que agem como desinfetantes, não têm a

capacidade de esterilizar, possuindo odor desagradável, provocar manchas. Algumas formulações são corrosivas às superfícies metálicas. Por isso, é essencial que, antes de adquirirem um esterilizante químico / desinfetante, o dentista e seu assistente devem obter o máximo de informações, mais detalhadas possível. Os autores concluíram que de posse das informações suficientes, as decisões posteriormente tomadas constituem um critério de eficácia para o caso e o potencial para uso indevido de produtos pode ser reduzido.

Em 1992, Iacopino e Wathen realizaram uma revisão da literatura sobre a relação entre as infecções por candidose oral e as estomatites em próteses totais. Os autores relataram que sobre dentaduras ou outras próteses totais, infecções com *Candida albicans* geralmente é a causa das estomatites protéticas. Este microorganismo consiste de um fungo dimórfico, existe sob a forma de blasto esporo (levedura) ou sob a forma micelial. Ambos são encontrados em tecidos infectados e se colonizam nas superfícies, porém o crescimento micelial de hifas alongadas invade os tecidos. As hifas longas não podem ser digeridas completamente pelos fagócitos hospedeiros, então, um mecanismo de morte extracelular é necessário para promover a eliminação do fungo. É raro encontrar estomatite protética sem um ou mais fatores predisponentes relacionados à baixa resistência do paciente. Células imunológicas protegem contra infecções por *Candida*. A estomatite protética afeta 65% dos usuários de próteses e a *Candida Albicans* pode iniciar, manter e exacerbar a doença. Os autores relatam que a ciência ainda tem que determinar a susceptibilidade do paciente. Além do óbvio envolvimento do ambiente e de fatores sistêmicos que promovem a condição, existe relativamente pouca informação a respeito da relação entre o perfil do paciente e a condição imunológica. A técnica de desinfecção de prótese total e tecidos bucais têm se desenvolvido e pode diminuir ou eliminar a necessidade de drogas anti-fúngicas de uso sistêmico ou tópico, o qual possui algumas desvantagens como a possível resistência a fungos. Além disso, náusea ou vômito pode ser induzido pelo gosto amargo da nistatina. Administrada como suspensão ou pomada, ela é mantida na boca por 5 minutos, no mínimo, três ou quatro vezes por dia, durante duas ou três semanas.

Ainda em 1992, Asad *et al.* realizaram um estudo que avaliou os efeitos da desinfecção através da imersão a longo prazo sobre as propriedades de resistência à flexão de resinas acrílicas para base de dentaduras. Para isso foram utilizados três diferentes tipos de substâncias desinfetantes, o glutaraldeído, a clorexidina e o álcool em dois tipos de resina acrílica. Foram confeccionados corpos-de-prova medindo 65 X 45 X 2,80mm, cada amostra foi imersa por sete dias em uma das três soluções desinfetantes e aquelas usadas como controle permaneceram imersas em água. Para os testes mecânicos, os autores avaliaram os módulos de ruptura e elasticidade das resinas testadas. O estudo foi realizado num contexto de crescente sensibilização para a importância do controle de infecção cruzada em consultórios odontológicos e laboratórios de prótese. Os resultados demonstraram que desinfetantes à base de álcool não são adequados para uso na desinfecção de resinas acrílicas.

Por meio de um estudo de casos de candidose oral, em 1992, Fotos *et al.* avaliaram 100 pacientes com diagnóstico confirmado da doença. Para cada paciente, os autores avaliaram a idade de apresentação da doença, sexo, queixa principal e inicial, sinais e sintomas foram revistos. Além disso, uma história médica completa foi obtida, incluindo acompanhamento das condições sistêmicas, medicação em curso e a terapia prescrita. A candidose oral pode estar presente como uma condição facilmente diagnosticável ou como mucosite agravada por várias outras doenças locais ou sistêmicas. O diagnóstico confiável deve sempre incluir uma combinação de sinais clínicos e sintomas sugestivos da doença de *Candida*, bem como os resultados citológicos positivos ou de cultura direta. Com base nas conclusões de estudos anteriores e os dados obtidos na população clínica do estudo, os autores concluíram que o tratamento de infecções por *Candida* deve ser individualizado para cada paciente, levando em consideração seus medicamentos atuais, seu estado imune, além de outras doenças concomitantes da mucosa e fontes de infecção exógena. A seleção dos agentes terapêuticos apropriados deve considerar os fatores de saúde do paciente, localização e gravidade da infecção, além da probabilidade de cronicidade. O sucesso terapêutico inicial da candidose deve ser acompanhado com reavaliações periódicas para

prevenir uma recaída clínica. Pacientes com predisposição para as micoses orais devido ao uso de próteses devem ser educados para a desinfecção adequada das próteses, reduzindo o risco de recorrência. Recaídas persistentes ou inexplicadas devem ser seguidas de uma avaliação imunológica.

O efeito de várias soluções desinfetantes na dureza superficial de resina acrílica para base de prótese total foi estudado por Asad *et al.*, em 1993. Eles relataram que há uma consciência crescente da importância do controle de infecção cruzada em consultórios odontológicos e laboratórios. O estudo avaliou os efeitos de diferentes soluções desinfetantes sobre a dureza superficial. Foi medida a resistência ao recuo, seguindo o método especificado pelo *British Standards Institute*. Os resultados demonstraram que a imersão da base de resina acrílica em solução desinfetante por até 24 horas não resulta em efeito significativo nos valores de dureza da resina acrílica.

Em 1993, Compagnoni *et al.* realizaram uma pesquisa visando estudar a influência da união prévia dos dentes artificiais na confecção das próteses totais antes da prensagem, a fim de observar em qual fase laboratorial (inclusão, polimerização ou demuflagem) tais alterações no plano horizontal possam ocorrer. Eles verificaram que tanto a fixação quanto a não-fixação dos dentes artificiais não impedem suas movimentações durante a polimerização das próteses totais. Além disso, durante a fase de inclusão das próteses, ocorrem modificações no posicionamento dos dentes artificiais.

Ainda em 1993, Brace *et al.* realizaram um estudo sobre a prática na desinfecção de próteses totais. Para isso, vinte e duas próteses parciais removíveis e totais foram retiradas diretamente da boca dos pacientes e foram enviadas para análise microbiológica. Durante a primeira fase do estudo, realizou-se a cultura 11 próteses contaminadas. As próteses foram tiradas da boca do paciente e colocadas diretamente em sacos de nylon esterilizados e a seguir em autoclave com 100 cc de solução salina estéril. O saco foi agitado pela mão por 1 minuto e, em seguida, deixou-se repousar durante 9 minutos. A amostra foi espalhada em 5% sangue de carneiro placa de cultura ágar. As próteses foram colocadas em um recipiente com solução desinfetante de

dióxido de cloro para o tempo de contato de 3 minutos recomendados pelo fabricante. A seguir foram lavadas com soro fisiológico estéril para remover o desinfetante residual e colocadas em sacos de nylon contendo 100 cc de solução salina estéril. Os sacos foram agitados por 1 minuto e em seguida, deixou-se repousar durante 9 minutos. Uma amostra de 0,001 ml desta solução foi espalhada sobre uma placa de ágar-sangue a 7%. E incubadas por 48 horas. As próteses do grupo controle foram tratadas da mesma forma, exceto que este grupo não foi desinfetado. O mesmo procedimento foi executado nas 11 próteses parciais removíveis. As próteses foram limpas por 15 segundos com uma escova de dente e clorexidina 4%. A seguir, foram pulverizadas de acordo com as instruções do fabricante em todas as superfícies com solução de dióxido de cloro. Após 3 minutos, as próteses foram lavadas com soro fisiológico para remover qualquer excesso de desinfetante e colocadas em 100 cc de soro fisiológico estéril e em sacos de autoclave estéreis. Os sacos foram agitados por 1 minuto e repousaram durante 9 minutos. Uma amostra de 0,001 ml da solução foi plaqueada em Ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas por 48 horas. O grupo controle foi tratado da mesma forma, mas não foi limpo ou desinfetado. Os autores concluíram que, historicamente, os procedimentos de controle de infecção foram ignorados porque eles são complexos, demandam tempo e são vistos como uma inconveniência em vez de uma necessidade. O método utilizando a fricção 15 segundos com clorexidina 4%, seguido por três minutos de contato com dióxido de cloro, demonstrou ser um método simples e eficiente de desinfecção de próteses.

O objetivo da revisão da literatura realizada por Lombardi e Budtz-Jørgensen, em 1993, foi discutir os principais procedimentos adotados para o tratamento da estomatite protética. Segundo os autores, o controle do biofilme na superfície interna das próteses removíveis, parciais ou totais, deve ser sempre indicado, independentemente da terapia adotada. A higienização inadequada das próteses é considerada um dos fatores etiológicos locais da estomatite protética. O uso contínuo das próteses também favorece o desenvolvimento da patologia, uma vez que prolonga o trauma local sobre a mucosa de contato. As próteses antigas também podem traumatizar a mucosa bucal em decorrência da falta de suporte promovida pela reabsorção do

rebordo alveolar. As próteses com condições inadequadas de suporte e estabilidade devem ser periodicamente reembasadas até que possam ser substituídas. As próteses novas devem ser somente confeccionadas quando a mucosa de suporte estiver saudável e o paciente apresentar boas condições de higiene bucal. Os pacientes devem ser instruídos a remover suas próteses durante a noite e higienizá-las após cada refeição. Vários agentes antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento da estomatite protética. A escolha de um agente específico é determinada por diversos fatores, como interação medicamentosa, função dos órgãos vitais (toxicidade) e aceitação (tolerância) pelo paciente. A utilização de agentes sistêmicos deve ser limitada aos pacientes que não responderem à terapia tópica ou quando fatores sistêmicos predisponentes estiverem presentes (diabetes não controlada, neutropenia, disfunções imunológicas e endócrinas). Antes da administração de terapia antifúngica, devem ser realizados testes micológicos que confirmem o diagnóstico clínico de estomatite protética. Esses testes incluem culturas da lesão e da superfície interna da prótese em meio de Ágar Sabouraud e exames citológicos por esfregaços. Entre os agentes antifúngicos, a nistatina (Mycostatin) deve ser utilizada apenas como tratamento tópico, pois é tóxica quando administrada parenteralmente. Devido ao gosto amargo, a nistatina pode produzir efeitos colaterais como náuseas e intolerância. A anfotericina B pode ser administrada via intravenal (candidose sistêmica) ou como agente tópico (candidose superficial). No entanto, esse medicamento pode produzir efeitos hepatotóxicos e náuseas. O cetoconazol (Nizoral) é administrado sistemicamente, sendo indicado para os casos de candidose mucocutânea crônica em pacientes com imunodeficiências. Esse antifúngico é pouco absorvido na ausência de acidez gástrica e pode reduzir a ação de alguns antibióticos. O miconazol (Daktarin) é amplamente utilizado para o tratamento de candidose por apresentar ação fungicida e bacteriostática para microorganismos gram-positivos, uma vez que bloqueia simultaneamente a síntese de esteróides e as proteínas das membranas das células microbianas. Esse fármaco também pode ser utilizado para o tratamento de lesões associadas à estomatite protética, como a queilite angular. O fluconazol (Diflucan) é indicado para o tratamento de candidose bucal em pacientes HIV-positivos. No entanto, esse medicamento pode produzir efeitos colaterais como

desconforto gástrico e dor de cabeça. Além disso, o fluconazol pode não apresentar o efeito terapêutico desejado por causa da resistência desenvolvida por algumas espécies de *Candida*. Como tratamento adjunto, pode-se realizar a imersão das próteses em agentes de limpeza como hipoclorito de sódio, enzimas, peróxidos alcalinos e ácidos. A utilização de substâncias antimicrobianas como a clorexidina também pode ser uma alternativa para a redução da inflamação da mucosa acometida pela estomatite protética. De acordo com o autor, independentemente da terapia antifúngica e do tratamento adjunto selecionados, os pacientes devem ser instruídos quanto à importância da adoção dos procedimentos de higienização das próteses e remoção das mesmas no período noturno, uma vez que esses cuidados atuam não apenas no controle da infecção causada pela estomatite protética, mas também na sua prevenção.

No estudo de Rosaspina *et al.*, em 1994, foi avaliado o efeito da irradiação de microondas na esterilização de instrumentais cirúrgicos contaminados com *C. albicans*. As amostras (50 lâminas de bisturi em aço inoxidável e 25 lamínulas de microscopia) foram contaminadas com *C. albicans* a uma concentração de 107 org/mL. Em seguida, 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 irradiadas, sendo esterilizadas em estufa por 2 horas a 140°C ou em autoclave por 20 minutos a 121°C. Amostras adicionais foram imersas em água fervente durante os mesmos tempos determinados para as exposições às microondas. Além disso, algumas foram preparadas para análise em MEV. As lâminas de bisturi e de microscopia foram colocadas em contato com placas de Petri contendo ágar tryptic soy e incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados demonstraram esterilização das amostras 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 inativação microbiana, embora não tenham sido observadas modificações na morfologia celular dos microrganismos. Foi

sugerido que as microondas produziram efeito letal inicial sobre os microorganismos sem provocar alterações em sua morfologia celular. A desintegração celular foi observada em tempo de exposição prolongado. Como as alterações morfológicas obtidas após a exposição em microondas foram completamente diferentes daquelas verificadas após o tratamento em água aquecida, os autores concluíram que, além de um efeito proporcionado pelo aumento de temperatura, as microondas também exerceriam um efeito mais complexo no corpo celular dos microorganismos. Esse efeito, segundo os autores, precisaria ser avaliado.

Em 1997, Nikawa *et al.* realizaram um estudo para avaliar o efeito de carboidratos na formação do biofilme de *Candida* em superfícies de resina acrílica recobertas por películas de saliva ou soro. Foram utilizados três isolados de *C. albicans*, dois de *C. glabrata* e dois de *C. tropicalis*. Amostras de resina acrílica (10 mm x 10 mm x 0,7 mm) foram confeccionadas por meio de técnicas convencionais de inclusão e polimerização de próteses. A saliva utilizada foi coletada de indivíduos saudáveis, enquanto o soro humano foi adquirido comercialmente. Após a incubação em saliva ou soro a 37°C por 1 hora, as amostras foram individualmente inoculadas por uma das suspensões fúngicas (10⁵ org/mL). A saliva ou o soro foi substituído por água destilada estéril nas amostras controle. Para promover aderência e colonização dos fungos, as amostras foram incubadas a 37°C por 2 horas. Em seguida, os carboidratos glicose ou galactose foram adicionados às amostras, que foram novamente incubadas por 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas a 37°C para avaliação do conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) dos microorganismos. Os resultados demonstraram maior atividade de biofilme nas amostras de uma das cepas de *C. tropicalis* cultivada em galactose. Atividade significativamente menor foi observada nos cultivos em galactose de uma das cepas de *C. glabrata* e da outra cepa de *C. tropicalis*. O cultivo de fungos em galactose demonstrou atividade de biofilme significativamente menor que o cultivo em glicose, exceto para uma das cepas de *C. tropicalis*. A presença de película de saliva aumentou de forma significativa a atividade de biofilme de todas as cepas de *C. albicans* e de uma cepa de *C. tropicalis*. Os autores sugeriram que uma dieta rica em glicose/galactose poderia modificar a formação de biofilme de *Candida*

ssp. sobre a superfície interna das próteses, tornando os pacientes mais susceptíveis ao desenvolvimento de estomatite protética.

Ainda em 1997, Tony *et al.* propuseram uma reclassificação para a candidose oral. Os autores esclareceram que a classificação atual de candidose oral pode causar confusão, em primeiro lugar, porque houve uma aplicação indiscriminada da nomenclatura relacionada à subdivisão clínica da doença, e, segundo, porque variantes clínicas incomuns têm aparecido juntamente com a progressão da pandemia do HIV. Os autores concluíram que o termo candidose multifocal tem sido encontrado literatura e pode ser usado para descrever a presença *Candida* eritematosa ou candidose associada. Lesões de *Candida* podem se apresentar de forma intra-oral ou perioral em um mesmo paciente, mas não deve ser considerada uma forma específica de candidose. A candidose oral pode, muitas vezes, aparecer em condições inocentes ou inofensivas, mas várias circunstâncias indicam que tais lesões devem ser levadas a sério, pois podem indicar comprometimento imunológico.

No ano de 1998, Wilson realizou um trabalho que analisou as evidências da etiologia, diagnóstico e tratamento da estomatite protética. Foi realizada uma revisão extensiva da literatura usando o Index da Literatura Dental com referências em publicações e bases de dados informatizadas. O autor relata que a evidência para a etiologia da estomatite protética é inconclusiva e muitas vezes contraditória. Estomatite por prótese pode estar presente em até 50% dos usuários de prótese total superior, sendo mais comum em mulheres e a prevalência aumenta com a idade. A administração do paciente deve ser por educação e motivação. Uma boa higiene da prótese é importante e estas devem ser retiradas à noite para dormir. Para a maioria dos casos, essas medidas normalmente irão levar a resolução completa do caso. Terapia antifúngica não deve ser utilizada sem a confirmação microbiológica do diagnóstico. Estomatite protética persistente pode ser devido ao não cumprimento do tratamento por parte do paciente ou devido a uma condição sistêmica predisponente que pode justificar encaminhamento para um médico. O estudo concluiu que se deve ter uma confirmação microbiológica dos

implicados na infecção por *Candida* antes de prescrever drogas antifúngicas, porém mais pesquisas são necessárias a respeito desta condição.

A efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de material reembasador resiliente contaminado com microorganismos patogênicos foi avaliada por Baysan *et al.*, em 1998. Os corpos-de-prova (2 cm X 2 cm) foram confeccionados em resina reembasadora resiliente (Molloplast B) e polimerizados em microondas a 650 W por 3 minutos. Todos os corpos-de-prova foram esterilizados em autoclave, inoculados com os microorganismos testados (*C. albicans* ou *S. aureus*) e incubados aerobicamente a 37°C. Após três dias de incubação, o meio de cultura foi descartado e os corpos-de-prova enxaguados cuidadosamente em 10 mL de solução de salina fosfatada tamponada (PBS) para remoção de células não aderentes. As amostras confeccionadas foram divididas em quatro grupos (três experimentais e um controle) com dez amostras cada. Três grupos experimentais foram avaliados quanto aos procedimentos de desinfecção, sendo as amostras do grupo A submetidas à desinfecção em microondas por 5 minutos a 650 W; as amostras do grupo B mantidas a seco em temperatura ambiente por 5 horas e as amostras do grupo C imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante a noite. Para o grupo controle, as amostras foram enxaguadas e deixadas em solução de PSB por 5 h 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 Ágar 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 em relação ao tratamento por microondas, a imersão em hipoclorito de sódio promoveu uma redução relativamente maior do número de microrganismos. Entretanto, apenas o grupo do procedimento a seco apresentou redução do número de células viável significativamente menor em relação aos demais grupos. Os autores recomendaram a utilização das microondas como um método de desinfecção, uma vez que o hipoclorito de sódio apresenta algumas desvantagens para utilização na clínica odontológica, sobretudo em longos

períodos de imersão, como efeitos deletérios sobre as resinas acrílicas das próteses e corrosão de componentes metálicos.

Web *et al.*, em 1998, avaliaram *in vitro* a eficácia de dois métodos de esterilização: irradiação por microondas e imersão em hipoclorito de sódio. Para o experimento, vinte próteses foram confeccionadas e inoculadas com cepas de *C. albicans* isoladas de saliva de pacientes saudáveis (n=10) e de *S. gordonii* isoladas de placa dentária (n=10). Dez próteses foram colocadas em 5 béqueres (2 próteses em cada béquer) contendo 110 mL de caldo Sabouraud, que foram contaminados com 11 mL de inóculo de *C. albicans* cultivado. Os béqueres foram, então, incubados em banho de agitação (80 agitações/min) a 37°C por 48 horas. As próteses selecionadas para desinfecção por microondas (n=5) foram individualmente irradiadas com diferentes tempos de exposição (1, 2, 4, 6, 8 e 10 minutos) em potência alta (604 W) e média (350 W). Após a irradiação, foi realizada a diluição seriada em solução salina e a semeadura das alíquotas em placas de Petri. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C e em seguida, calcularam-se os valores de UFC/mL. As próteses do grupo controle não foram irradiadas, tendo sido somente imersas em solução salina. Para desinfecção por imersão, as próteses contaminadas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, 0,02% ou 0,0125% por 8 horas, enquanto que as próteses do grupo controle foram imersas em água destilada pelo mesmo período. Em seguida, o mesmo protocolo experimental para análise microbiológica descrita para as próteses irradiadas foi utilizado. Algumas amostras em resina acrílica de cada condição foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura. Os resultados evidenciaram que a irradiação em microondas por 6 minutos a 350 W foi efetiva para eliminar o crescimento de *C. albicans* e *S. gordonii*, apesar desse procedimento não ter removido os microorganismos não-viáveis das superfícies das próteses. Além disso, a imersão das próteses por 8 horas em hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,02 e 0,0125 % eliminou o crescimento de *C. albicans* e reduziu o crescimento de *S. gordonii*. A remoção desses microorganismos da superfície das amostras foi observada nas análises em microscopia eletrônica de varredura. Dessa forma, os autores indicaram que a irradiação em microondas por 6 minutos a 350 W poderia ser mais efetiva para a esterilização

de próteses que a imersão em hipoclorito de sódio, apesar de nenhum procedimento efetivamente eliminar todos os microrganismos das superfícies das próteses.

Border & Rice-Spearman, 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 meio de cultura Trypticase Soy Broth (TSB) e incubados a 37°C por 24 horas. A seguir, 25 mililitros de cada solução foram irradiados a 650 Watts por 5 segundos. Esse procedimento foi repetido e, após 15 segundos de intervalo, uma nova irradiação de 90s foi realizada. Os meios de cultura irradiados foram semeados em placas de Petri incubadas 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 Watts 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 posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias foram quantificadas em números por quadrante. Além disso, um frasco contendo TSB não inoculado foi irradiado em intervalos de um minuto até um total de 5 minutos de irradiação e semeados em placas de Petri a cada intervalo. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados demonstraram que foram necessários 60 segundos de irradiação para a esterilização de todos os microrganismos presentes no meio de cultura, nos gases 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.* avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de resinas acrílicas contaminadas com *C. albicans* e seu efeito sobre a dureza desses materiais. Na fase 1 do experimento foram confeccionados 45 corpos-de-prova (10 x 10 x 3 mm) de cada material, sendo três rembasadores resilientes (Molloplast-B, Permaflex e/ou Permasoft) e uma resina termopolimerizável (Lucitone 199). Os corpos-de-prova foram

submetidos aos ensaios de dureza (durômetro Shore A) e então inoculados com *C. albicans*. Após 48 horas, 30 corpos-de-prova foram irradiados a seco por 5 minutos em potência máxima, e o crescimento microbiológico foi avaliado por semeadura em placas de Petri. A esterilização em longo prazo (duas semanas) foi observada pela análise de crescimento visível no meio de tioglicolato contendo os corpos-de-prova desinfetados imersos nesse meio. Após 2 semanas, as leituras de dureza foram realizadas novamente para todos os corpos-de-prova. Para a fase 2, 15 corpos-de-prova de cada material foram irradiados a seco pelos tempos de exposição de 10 ou 15 minutos e submetidos aos ensaios de dureza. Na fase 3, 15 corpos-de-prova de cada material foram imersos em água e irradiados por 5 minutos em potência máxima. Para avaliar o efeito desse procedimento sobre a dureza, os corpos-de-prova foram irradiados por 5 vezes. De acordo com os resultados, a irradiação a seco por 5 minutos não esterilizou nenhum dos materiais avaliados. Além disso, os corpos-de-prova não imersos e irradiados por 10 e 15 minutos não foram eficientemente esterilizados para todos os materiais avaliados. Entretanto, uma esterilização efetiva foi observada somente após a irradiação em microondas por 5 minutos quando os corpos-de-prova foram imersos em água. Os corpos-de-prova de todos os materiais não imersos e irradiados por 15 minutos e os corpos-de-prova imersos em água e irradiados por 5 minutos não resultaram em alteração de dureza clinicamente significativa. As 5 irradiações consecutivas de um mesmo corpo-de-prova resultou em alteração significativa na dureza do material PermaSoft. Os autores concluíram que 5 minutos de irradiação, foram suficientes para eliminar *C. albicans* desde que os materiais testados estivessem imersos em água durante o procedimento de irradiação.

A relação entre infecções fúngicas e hospedeiros imunocomprometidos foi analisada por Wanke *et al.* numa revisão da literatura, em 2000. Os autores descreveram que nos últimos anos, muitas mudanças notáveis ocorreram em nosso modo de vida, gerando oportunidades para infecções microbianas. Todas essas mudanças estão relacionadas com o recente aparecimento de doenças previamente não reconhecidas, ou ao ressurgimento de doenças que, pelo menos nos países desenvolvidos,

deveriam estar controladas. Este conceito é aplicado às infecções fúngicas e seus agentes, em hospedeiros imunocomprometidos. O padrão dessas infecções, portas de entrada de fungos no hospedeiro humano, fungos de patogenicidade e os principais fatores predisponentes foram analisados nesse estudo. Infecções fúngicas oportunistas em pacientes com câncer, transplantados e com síndrome da imunodeficiência adquirida são revistos, especialmente no que se refere a candidíase e aspergilose. Muitas outras infecções oportunistas fúngicas não mencionados podem tornar-se uma ameaça para a saúde de alguns grupos de risco particulares. *Malassezia* e *Trichosporos* são considerados dois emergentes leveduriforme patogênicos de fungos basidiomicetos e a importância de identificar outras espécies de *Candida*, além da *C. albicans*, como patógenos oportunistas é freqüentemente relatada, bem como a importância crescente de alguns *Hyphomycetes*, como as espécies de *Fusarium*, *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e o *Mucorales*. Considerando que os fungos são significativamente a causa de morbidade e mortalidade de pacientes imunocomprometidos, e que os oportunistas que causam infecções são graves ameaças de vida, um diagnóstico rápido e eficiente para fins terapêuticos é essencial. Além disso, o diagnóstico preciso baseia-se na identificação morfológica das formas de tecido em material de biópsia ou pus por cultura e microscopia. O diagnóstico final do agente só é alcançado após a cultura de material obtido das lesões. Os autores concluíram que a detecção de anticorpos específicos e antígenos específicos e/ou metabólitos em fluidos corporais ou tecidos podem ser de grande valia no futuro, especialmente as técnicas de diagnóstico molecular.

Chandra *et al.*, em 2001, desenvolveram um modelo reproduzível de biofilme de *C. albicans* em prótese para determinar a susceptibilidade de isolados do microorganismo a quatro agentes antifúngicos (nistatina, anfotericina, fluconazol, clorexidina). Inicialmente foi obtida uma suspensão celular de dois isolados de *C. albicans*, sendo um de paciente com estomatite protética e um de paciente HIV-positivo com candidose orofaríngea. Para a formação do biofilme, uma alíquota da suspensão celular foi aplicada nas superfícies de um corpo-de-prova de resina acrílica. A susceptibilidade da *C.*

albicans presente no biofilme foi comparada a de células planctônicas desse microrganismo. Houve 50% de redução da atividade metabólica do biofilme quando os antifúngicos nistatina, anfotericina, clorexidina e fluconazol foram aplicados nas concentrações de 8 µg/mL, 16 µg/mL, 128 µg/mL e superior a 64 µg/mL, respectivamente. Entretanto, as células planctônicas de *C. albicans* foram susceptíveis aos agentes antifúngicos, com 50% de redução da atividade metabólica para as concentrações de 0,25 µg/mL, 1 µg/mL, 4 µg/mL e 0,5 µg/mL dos antifúngicos nistatina, anfotericina B, clorexidina e fluconazol, respectivamente. Os autores concluíram que, comparadas às células planctônicas, as células de *C. albicans* associadas ao modelo de biofilme em prótese apresentaram resistência aos antifúngicos mais frequentemente utilizados para o tratamento da estomatite protética.

Em 2002, numa revisão da literatura sobre candidose oral, Akpan e Morgan ressaltaram que a candidíase oral é uma infecção oportunista comum da cavidade oral, causada por um crescimento excessivo de *Candida*, sendo mais comum a *Candida albicans*. A incidência varia dependendo da idade e de certos fatores predisponentes. A classificação consiste em três grandes agrupamentos, consistindo de candidíase aguda, candidíase crônica, e queilite angular. Os fatores de risco incluem problemas salivares devido ao mau funcionamento das glândulas, drogas, próteses mal adaptadas, níveis elevados de hidrato de carbono, tabagismo, diabetes mellitus, síndrome de Cushing, tumores malignos, e condições de imunossupressão. A terapêutica envolve história, exames e adequado tratamento antifúngico, com algumas amostras que necessitam ser colhidas para análise laboratorial. Em certos grupos de alto risco, a profilaxia antifúngica reduz a incidência e a severidade das infecções. O prognóstico é bom na grande maioria dos casos.

O objetivo do estudo de Torres *et al.*, em 2002, foi avaliar a relação entre o nível de fluxo salivar (SFRs) e a quantidade de *Candida* spp. Em pacientes com xerostomia. Foram selecionados 112 pacientes do Hospital da Universidade Federal do Rio de Janeiro que, ao responderem um questionário de saúde, relataram apresentar pelo menos um dos sintomas associados

xerostomia. Amostras de saliva foram coletadas dos pacientes no período das 9 às 11 horas da manhã. O nível de fluxo salivar inferior a 1,0 mL/min foi considerado como hipossalivação. As amostras coletadas foram aquecidas durante 2 minutos a 55°C para desagregação dos componentes da saliva. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em agitador e alíquotas de 0,1 mL das soluções resultantes foram semeadas em placas de Chromagar incubadas por 72 horas. De acordo com os resultados, a hipossalivação estava presente em 58% dos pacientes, dos quais 67,9% apresentavam colonização por *Candida* spp. Foi demonstrado que, nos pacientes com quantificação de *Candida* spp. igual ou superior a 400 UFC/mL, quanto menor o fluxo salivar, maior o número de colônias. Além disso, os pacientes do gênero masculino apresentaram nível de fluxo salivar superior em relação ao gênero feminino, independentemente do uso de medicamentos ou da presença de doenças sistêmicas. Não houve relação significativa entre a quantidade de *Candida* spp. e o gênero ou a idade dos pacientes. A presença de colonização mista por diferentes espécies de *Candida* foi observada em 28% dos pacientes, sendo a *C. albicans* a mais freqüente (84,8%). Os autores concluíram que, nos pacientes com valores elevados de UFC/mL, houve uma relação inversa entre o fluxo salivar e a quantidade de *Candida* spp.

O objetivo de Pires *et al.*, em 2002, foi avaliar a associação entre estomatite protética e o fluxo salivar, bem como a quantificação e a identificação das espécies de *Candida*, antes e 6 meses após a substituição das próteses totais superiores. Setenta e sete voluntários foram incluídos no estudo, com idade entre 36 e 84 anos, sendo a maioria mulheres (63,6%). A estomatite protética foi classificada de acordo com os critérios de Newton e a higiene da prótese foi qualificada como boa, regular, deficiente ou inadequada. Para a determinação do fluxo salivar, amostras de saliva não estimulada foram coletadas dos pacientes durante 5 minutos. Alíquotas das amostras coletadas foram semeadas em Sabouraud Dextrose Ágar e, após 48 horas de incubação, foi realizada a contagem de colônias viáveis (UFC/mL). As espécies de *Candida* foram identificadas pelos testes de tubo germinativo, produção de clamidósporos e assimilação e fermentação de carboidratos. Todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal após a substituição das

próteses totais e não foram medicados. Após 6 meses da substituição, os pacientes retornaram para uma segunda avaliação, onde todos os procedimentos clínicos e laboratoriais realizados previamente foram repetidos. Os resultados demonstraram que, na primeira avaliação, 50,6% dos pacientes apresentavam estomatite protética e 63% demonstravam higienização inadequada das próteses. Na segunda avaliação, a porcentagem de pacientes com estomatite protética foi reduzida a 18,2% e a higienização das próteses foi considerada regular em 100% dos casos. Em ambas as avaliações, a prevalência de estomatite protética foi maior em pacientes do sexo feminino. O fluxo salivar dos pacientes variou de 0,02 mL/min a 1,66 mL/min e foi semelhante nas duas avaliações. Espécies de *Candida* foram identificadas em 84,4% dos pacientes na primeira avaliação e em 79,2% na segunda. Todos os portadores de estomatite protética apresentaram *Candida* spp. na saliva e o número de UFC/mL da maioria desses pacientes foi superior a 400. A *C. albicans* foi a espécie mais comum em ambas as avaliações (50%) e a associação mais encontrada foi entre esse microorganismo e a *C. tropicalis* (15,4%). Os autores concluíram que a substituição das próteses e a melhora da higiene bucal promoveram a resolução dos sinais clínicos de estomatite protética. Entretanto, a persistência de elevada contagem de *Candida* spp. na saliva dos pacientes deveria ser considerada como um fator importante na recorrência da patologia. Os autores sugeriram que a substituição periódica das próteses e as instruções adequadas de higiene bucal são fundamentais para prevenir o desenvolvimento da estomatite protética.

Goodson *et al.*, em 2003, avaliaram a efetividade de um agente para a limpeza de próteses totais associado à irradiação de microondas, na desinfecção de próteses totais. Os autores utilizaram fragmentos de vinte próteses que haviam sido utilizadas por 12 a 48 anos. Esses fragmentos 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, em 3 diferentes meios de cultura específicos para leveduras, para microorganismos facultativos/anaeróbios e para microorganismos que exigem nutrientes especiais. Em seguida, os seguintes procedimentos de limpeza foram utilizados: imersão em um agente

de limpeza experimental (Polident com Polishield) e irradiação em microondas por 2 minutos; imersão em solução de Polident (solução a base de ácido cítrico e carbonato de sódio) e irradiação durante 2 minutos imersão no agente de limpeza Polident e imersão em água por 5 minutos. A contagem das unidades formadoras de colônia foi obtida antes e após cada um desses procedimentos de limpeza. Os resultados demonstraram que a irradiação em microondas melhorou significativamente a eficácia do Polident na redução do número de microrganismos viáveis das próteses, tendo sido concluído que a utilização diária desse procedimento poderia prevenir o ciclo de reinfecção dos pacientes pelas próteses contaminadas com os microrganismos causadores de candidose oral, entre os quais a *C. albicans*.

A relação entre a presença de *C. albicans* e a estomatite protética foi avaliada por Barbeau *et al.*, em 2003. Foram selecionados 68 usuários de próteses totais superiores. O tipo de estomatite protética foi determinado de acordo com a classificação de Newton bem como por uma classificação modificada, desenvolvida pelos autores. Essa última classificação foi utilizada para determinar tanto o tipo de estomatite protética quanto a extensão da inflamação nos tecidos acometidos por essa patologia. Para a avaliação clínica, foram realizadas três fotografias da região palatina de cada paciente. As leveduras foram coletadas da mucosa palatina e da superfície interna das próteses com *swab* oral. As culturas das suspensões obtidas dos *swabs* foram realizadas em ágar Sabouraud. Para isolar as leveduras, foi adicionado cloranfenicol aos meios de cultura Sabouraud e Lee. As colônias isoladas foram congeladas a -80°C . Para a identificação das espécies de *Candida*, alíquotas das suspensões das colônias isoladas foram cultivadas em meio cromogenico (Chromagar). Para a diferenciação final das espécies, as suspensões também foram submetidas à avaliação por um sistema comercial de identificação (ID Candida). Os resultados demonstraram que a presença de leveduras nas próteses não foi associada à estomatite protética de acordo com a classificação de Newton. Os maiores números de colônias e índices de placa nas próteses foram associados à maior extensão de inflamação, independentemente do tipo de estomatite protética segundo a classificação de Newton. A presença de *C. albicans* e da associação de mais de uma espécie

de *Candida* foi observada mais comumente nos usuários de próteses totais com estomatite protética. As espécies mais associadas com a *C. albicans* foram *C. tropicalis* e *C. glabrata*. A utilização contínua das próteses e o fumo foram considerados fatores de risco associados a extensão da inflamação observada nos pacientes com estomatite protética. Os autores concluíram que a presença de leveduras nas próteses foi significativamente relacionada a extensão da inflamação e não ao tipo de estomatite protética segundo a classificação de Newton. Foi sugerido que a colonização por *Candida* sp. foi favorecida pelo processo de inflamação causado pela estomatite protética e que, portanto, deveria ser considerada no diagnóstico e tratamento dessa doença.

O estudo de Neppelenbroek *et al.*, em 2003, teve por objetivo avaliar a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de resinas rígidas para reembasamento imediato. Corpos-de-prova (10 mm x 10 mm 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) em caldo de tryptic soy contendo um dos seguintes microrganismos: *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* ou *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 minutos. Quarenta corpos-de-prova não irradiados foram utilizados como controle positivo. A seguir, 25 µL da suspensão resultante das diluições seriadas de 10^{-1} 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 horas. Após a incubação, as colônias foram quantificadas em ufc/mL. Os corpos-de-prova irradiados foram imersos em caldo de tryptic soy e incubados a 37°C por 7 dias. Vinte corpos-de-prova foram preparados para MEV. Todos os corpos-de-prova demonstraram esterilização após a irradiação em microondas. A análise em MEV indicou alteração na morfologia celular dos microrganismos após a irradiação em microondas. Os corpos-de-prova irradiados e incubados por 7 dias não demonstraram crescimento microbiológico visível no meio de cultura. A

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

O estudo de Pavarina *et al.*, em 2003, avaliou a efetividade de um protocolo para controle de infecção para limpeza e desinfecção de próteses dentais removíveis. Para esse estudo foram selecionados 32 pacientes e um total de 64 próteses (entre totais e parciais) que já tinham sido usadas por pelo menos 6 meses. As culturas foram obtidas no momento da remoção das próteses da boca dos pacientes e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, e o meio de cultura foi observado para determinar a presença de crescimento microbiológico. Previamente à desinfecção, o material orgânico remanescente, presente nas próteses, foi eliminado por escovação com clorexidina 4%, durante 1 minuto e, posteriormente, as próteses foram lavadas durante 1 minuto em água estéril. As próteses foram imersas em 200 mL, durante 10 minutos, em uma das seguintes soluções: a) gluconato de clorexidina 4%; b) hipoclorito de sódio 1 %; c) Biocide 0, 48%; d) Amosan 3,78%. Os autores observaram que o uso de escovação com clorexidina combinada com uma das três soluções avaliadas (Amosan, gluconato de clorexidina 4% e hipoclorito de sódio 1%) foi efetivo na redução do crescimento de microorganismo, após 10 minutos. Esse protocolo mostrou ser adequado para prevenir a contaminação cruzada.

O objetivo do estudo de Coelho *et al.*, em 2004, foi realizar um levantamento da freqüência de lesões da mucosa bucal relacionadas com próteses, em pacientes atendidos em uma faculdade de odontologia brasileira e determinar se as lesões orais tinham relação com idade, gênero, tipo de prótese, tempo de uso e com métodos de limpeza. As lesões relacionadas com próteses observadas neste estudo foram candidíase crônica atrófica, candidíase crônica hiperplásica, hiperplasia inflamatória fibrosa induzida por prótese, úlceras traumáticas, queilite angular e hiperplasia de bordo. A lesão mais comum, candidíase crônica atrófica, ocorreu com mais freqüência em mulheres, em usuárias de prótese total maxilar, com uso da mesma por 16-20 anos. O método mais comum de limpeza das próteses foi uma escova de dente e creme dental. Segundo os autores, os resultados sugerem que a prótese

pode causar uma grande variedade de lesões na mucosa bucal, que poderiam ser prevenidas com acompanhamento para avaliar as próteses e por meio de instruções para manter os tecidos orais saudáveis.

Na tentativa de diferenciar as espécies de *Candida*, correlacioná-las com as regiões anatômicas e avaliar a susceptibilidade a cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B, Crocco *et al.*, em 2004, realizaram um estudo avaliando 100 pacientes imunocompetentes com candidíase cutânea ou mucosa atendidos na Santa Casa de S. Paulo entre maio de 1999 e julho de 2001. Correlacionou-se a região acometida e a espécie de *Candida*, isolada através técnica Chromagar *Candida*. Avaliou-se a susceptibilidade das espécies a cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B, através do Etest. Os resultados mostraram que *C. albicans* foi isolada em 76,0% dos materiais, *C. krusei* em 19% e *C. tropicalis* em 1%. Não houve correlação significativa entre a região acometida e as espécies. A maioria das amostras mostrou susceptibilidade aos antifúngicos. Os autores concluíram que *C. albicans* foi a espécie mais observada. A maioria das amostras de *Candida* mostrou-se susceptível aos antifúngicos.

Em 2005, Campanha *et al.* avaliaram o efeito da desinfecção por microondas (650 W/6 minutos) sobre a dureza Vickers de dentes artificiais de resina acrílica de seis marcas comerciais (Dentron, Vipi Dent Plus, Postaris, Biolux, Trilux e Artiplus). Para a obtenção dos corpos-de-prova, os dentes artificiais foram individualmente incluídos em resina acrílica termopolimerizável dentro de tubos de PVC. Para cada marca comercial, a superfície oclusal de 32 dentes idênticos foi desgastada com lixas de carbetto de silício e polida com branco de Espanha. Os corpos-de-prova foram divididos em quatro grupos: GI (controle) - o teste de dureza foi realizado após o polimento; GII- antes do teste, os corpos-de-prova foram imersos em 200 mL de água destilada e submetidos a dois ciclos de desinfecção por microondas (650 W/6 minutos); GIII- a dureza dos corpos-de-prova foi avaliada após a armazenagem em água destilada por 90 dias; GIV- antes do teste de dureza, os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada por 90 dias e submetidos a dois ciclos de desinfecção por microondas (650 W/6 minutos). Os resultados demonstraram

que a desinfecção por microondas reduziu a dureza dos dentes artificiais não armazenados em água. Para todas as marcas comerciais, exceto a Artiplus, os valores médios de dureza dos dentes artificiais armazenados em água por 90 dias e submetidos à desinfecção por microondas não foram significativamente diferentes dos observados para os dentes apenas armazenados em água. Os autores concluíram que, para cinco marcas comerciais (Dentron, Vipi Dent Plus, Postaris, Biolux e Trilux), a dureza Vickers dos dentes artificiais armazenados em água por 90 dias não foi significativamente alterada por dois ciclos de desinfecção por microondas (650 W/6 minutos).

Pavarina *et al.*, em 2005, investigaram o efeito da desinfecção por microondas (650 W/ 6 minutos) sobre a resistência à flexão de cinco resinas para reembasamento (Kooliner, Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard, New Truliner e Duraliner II) e uma resina para base de prótese (Lucitone 550). Para o experimento foram confeccionados trinta e dois corpos-de-prova (3,3 x 10 x 64 mm) para cada resina acrílica, separados em oito grupos contendo oito corpos-de-prova. O ensaio de flexão foi realizado após a polimerização (G1); após dois ciclos de desinfecção por microondas (G2); após sete dias de armazenagem em água (G3) e após sete ciclos de desinfecção (G4). Os corpos-de-prova do G4 foram irradiados diariamente e imersos em água entre as exposições. Os resultados demonstraram que dois ciclos de desinfecção em microondas promoveram aumento significativo na resistência à flexão das resinas acrílicas Kooliner e Lucitone 550. Após sete ciclos, as resinas Kooliner e New Truliner apresentaram aumento significativo nos valores de flexão. A resistência à flexão do material Tokuso Rebase não foi significativamente influenciada pela irradiação. Sete ciclos de desinfecção em microondas resultaram em diminuição significativa do material Duraliner II. Resultados similares foram observados para o material Ufi Gel Hard; porém, após 2 e 7 ciclos de desinfecção em microondas. Os autores concluíram que a desinfecção em microondas não alterou a resistência flexural dos materiais avaliados, com exceção do material Ufi Gel Hard.

He *et al.*, em 2006, realizaram estudo *in vitro* com o objetivo de comparar a adesão de espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*

e *C. dubliniensis*) a 4 diferentes materiais para bases de próteses, autopolimerizáveis e termo-polimerizáveis. Para o experimento, corpos-de-prova de 5 mm x 5 mm foram confeccionados, esterilizados, imersos em 300 mL de suspensão das cepas avaliadas ($3-4 \times 10^6$ ufc/ml) e agitados (75 rpm) a 35°C por 2 horas. Após esse período, cada corpo-de-prova foi lavado com solução salina fosfatada tamponada estéril para a remoção das células não viáveis e colocado para secar a 60°C durante o período da noite. Os corpos-de-prova foram, então, corados e montados sobre lâminas e sob lamínulas de vidro. As cepas aderentes foram contadas com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Os autores encontraram diferença estatisticamente significativa na adesão de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* entre a resina auto-polimerizável e a termopolimerizável e apenas a espécie *C. glabrata* se aderiu a todos os materiais avaliados. Os autores concluíram que a aderência de *Candida* aos materiais para base de prótese depende da qualidade da resina utilizada e da espécie de *Candida* avaliada. Além disso, foi observado que, em geral, menor número de células aderiu às resinas termo ativas em comparação às resinas quimicamente ativas.

O estudo de Silva *et al.*, em 2006, teve por objetivo avaliar a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de próteses totais. Oitenta próteses totais padronizadas foram confeccionadas e submetidas à esterilização por meio de óxido de etileno. As próteses foram, individualmente, inoculadas (10^7 UFC/mL) com meio de cultura Tryptic Soy Broth contendo um dos seguintes microorganismos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Após 48 horas de incubação a 37°C, 40 próteses foram imersas em 200 mL de água e irradiadas a 650 W por 6 minutos. Quarenta amostras não irradiadas foram utilizadas como controle. As diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} foram obtidas e 25 μ L da suspensão resultante de cada diluição foram semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura seletivos para cada microorganismo. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após a incubação, as colônias foram quantificadas em UFC/mL. Para verificar a efetividade da exposição às microondas em longo prazo, as amostras irradiadas foram imersas em meio de cultura e incubadas a 37°C por 7 dias. Não houve crescimento microbiano após

48 horas para as próteses contaminadas com *C. albicans*, *S. aureus* e *B. subtilis*. Um pequeno número de colônias foi observado em 2 placas de Petri para o microorganismo *P. aeruginosa*. Após 7 dias de incubação a 37°C, houve crescimento microbiológico em 3 culturas de Tryptic Soy Broth, sendo 2 para *P. aeruginosa* e 1 para *B. subtilis*. Todas as próteses totais do grupo controle apresentaram crescimento microbiano nas placas de Petri após 48 horas de incubação a 37°C. A irradiação por microondas por 6 minutos a 650 W provou ser um método rápido e efetivo para desinfecção das próteses totais contaminadas com *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, além de promover a esterilização das próteses inoculadas com *C. albicans* e *S. aureus*.

Com o objetivo de avaliar a efetividade de diferentes tempos de irradiação por microondas na desinfecção de resina rígida para reembasamento imediato, Mima *et al.*, em 2007, inocularam 240 corpos-de-prova (10 x 10 x 1 mm) com um dos seguintes microorganismos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Após 48 horas de incubação a 37°C, os corpos-de-prova foram separados em 6 grupos (n=10), imersos em 200 mL de água e submetidos à irradiação em microondas (650W) em um dos seguintes tempos experimentais: G I - 1 min.; G II - 2 min.; G III - 3 min.; G IV - 4 min. e G V - 5 min. A seguir, 25 µL da suspensão resultante das diluições seriadas de 10⁻³ a 10⁻⁶ foram semeados em placas de Petri, que foram incubadas a 37°C por 48 horas. 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 e 44 corpos-de-prova foram preparados para microscopia eletrônica de varredura. Todos os corpos-de-prova dos grupos III, IV e V demonstraram efetiva esterilização após a irradiação em microondas. Para o grupo II, as amostras contaminadas com *C. albicans* também foram esterilizadas após a irradiação. Todos os corpos-de-prova do grupo I apresentaram crescimento microbiológico após incubação por 48 horas e 7 dias. A análise em microscopia eletrônica de varredura indicou alteração na morfologia celular dos microorganismos presentes nas amostras esterilizadas. Os autores concluíram que a irradiação por microondas a 650 W durante 3, 4 e 5 minutos demonstrou ser um método efetivo de esterilização para resina reembasadora rígida.

Na tentativa de avaliar os efeitos de soluções de vinagre (ácido acético) sobre *C. albicans* aderidas, *in vitro*, na superfície de resina acrílica utilizada na confecção de próteses, Andrade *et al.*, 2008, realizaram um estudo com trinta e seis corpos-de-prova em resina acrílica termicamente ativada os quais foram imersos em cultura de *C. albicans* (37°C/24 h), sendo a seguir desinfetados em solução de vinagre por 30 min (n=12) e 60 min (n=12). Foram utilizadas soluções de vinagre a 10% (n=6) e 30% (n=6) e solução fisiológica 0,85% (n=6) para cada tempo de imersão. Após desinfecção, os corpos-de-prova foram lavados em solução fisiológica e a partir da solução obtida após agitação, foram realizadas diluições decimais, as quais foram semeadas em Ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C/48 h. A seguir foram quantificados os log de UFC/mL de suspensão contendo microrganismos aderidos aos corpos-de-prova. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey (p=0,05). Os resultados demonstraram que ocorreu redução significativa no log UFC/mL de *C. albicans* nos corpos-de-prova submetidos a tratamento com solução de vinagre a 10 e 30% em relação ao controle. Os autores concluíram que não ocorreu diferença significativa quando da utilização do vinagre, nos tempos de 30 e 60 minutos para as duas concentrações do produto (10 e 30%).

Ribeiro, em 2008, avaliou o efeito da irradiação por microondas sobre as propriedades mecânicas de resistência à flexão e dureza de resinas acrílicas (Kooliner, Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard C, New Truliner e Lucitone 550). Para a irradiação, cada corpo-de-prova foi individualmente imerso em 200 mL de água destilada e submetido a dois ciclos de irradiação a uma potência constante de 650 W, variando-se o tempo de exposição (0 a 5 minutos). Os resultados demonstraram que para a resina Kooliner a elevação no tempo de exposição às microondas promoveu aumento na resistência à flexão em todos os tempos avaliados, porém esse aumento foi significativo somente após 5 minutos de irradiação, em comparação ao controle. A resistência à flexão dos Materiais Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard C, New Truliner e Lucitone 550 não foram alteradas pelos tempos de desinfecção testados. Foi demonstrado que a dureza Vickers da resina Kooliner aumentou

significativamente após 3, 4 e 5 minutos de irradiação em relação ao controle. Para a resina Ufi Gel Hard C, o aumento significativo em relação ao controle ocorreu em 4 e 5 minutos. Já para New Truliner, apenas a média de dureza após 5 minutos de irradiação foi significativamente maior que o controle. Os valores de dureza da resina para base de prótese Lucitone 550 não foram significativamente alterados pelos tempos de desinfecção avaliados, quando comparados ao controle. Dessa forma, foi verificado que a desinfecção em microondas não ocasionou efeitos deletérios na resistência à flexão e dureza dos materiais avaliados, independente do tempo de irradiação utilizado.

O objetivo do estudo realizado por Campos *et al.*, em 2009, foi avaliar o efeito cumulativo de dois protocolos de desinfecção por energia de microondas na rugosidade superficial (Ra) e adaptação de bases de prótese total de duas resinas polimerizadas por microondas (Onda Ceryl) ou em água aquecida (QC 20). No protocolo 1 foi realizada desinfecção por 6 minutos a potência de 690 W; já no protocolo 2 foi realizada desinfecção por 6 minutos a potência de 345 W. Para análise da rugosidade, espécimes retangulares foram fabricados e separados de acordo com o tratamento de desinfecção (n=8/grupo): 1) Controle (sem desinfecção), 2) Protocolo 1, e 3) Protocolo 2. Para medir a Ra usou-se um rugosímetro no baseline (T0) e após 2 procedimentos de desinfecção (T1, T2) com intervalo de 7 dias de imersão em água destilada. Para avaliar a estabilidade dimensional, bases maxilares foram separadas em 3 grupos (n=6) e a adaptação foi medida por pesagem de uma película de silicone que reproduzia o espaço entre a base de resina e um modelo-mestre metálico. No que se refere à rugosidade, houve interação significativa entre tipo de resina e técnica de polimerização, tratamento de desinfecção, e número de procedimentos de desinfecção ($P<0,001$). Os grupos Protocolo 2 e controle apresentaram aumento semelhante de Ra ao longo do tempo, mas os grupos Protocolo 1 tiveram redução significativa de Ra em T2. A adaptação da base foi afetada por interação significativa entre tratamento de desinfecção e número de procedimentos de desinfecção ($P<0,001$); o Protocolo 1 apresentou a maior média em T2. Os autores concluíram que a resina Onda Ceryl teve maiores alterações de Ra e adaptação que QC-20. O Protocolo 1

promoveu dano geral para ambos os tipos de resina após dois procedimentos de desinfecção.

Em 2009, Novais *et al.*, realizaram um estudo com o objetivo de determinar o efeito da irradiação em microondas na porosidade de reembasadores rígidos diretos (Kooliner – K, New Truliner – NT, Tokuso Rebase Fast – TR e Ufi Gel Hard – UGH) e de uma resina acrílica convencional (Lucitone 550). Corpos-de-prova foram obtidos a partir da impressão da superfície palatal de um indivíduo e separados em quatro grupos. As amostras foram avaliadas após a polimerização (C1), após dois ciclos de desinfecção em microondas por 6 minutos a 650 W (MW2), após sete ciclos de desinfecção em microondas utilizando o mesmo tempo e potência (MW7) e após 7 dias de armazenagem em água a 37°C. A análise da porosidade foi realizada por micrografia digital e microscopia eletrônica. Sete ciclos de desinfecção resultaram em aumento significativo no número de poros do material K, mas diminuíram o número nos materiais TR e UGH. O número de poros nos materiais NT e L não foram afetados após a desinfecção em microondas. Dessa forma, os autores concluíram que diferenças na porosidade entre materiais e para as diferentes condições experimentais foram observadas após a desinfecção em microondas.

Em estudo realizado em 2009, Paranhos *et al.* avaliaram a estabilidade de cor, rugosidade superficial e resistência à flexão de resina acrílica polimerizada por microondas após desinfecção em hipoclorito de sódio, simulando 20 minutos de desinfecção diária durante 180 dias. Quarenta espécimes circulares (15 x 4 mm) e 40 retangulares (65 x 10 x 3 mm) foram preparados em resina acrílica polimerizada por microondas (Onda-Cryl). As amostras foram imersas em hipoclorito de sódio a 0,5%, hipoclorito de sódio a 1%, Clorox/Calgon e água destilada (controle). Medidas de cor foram determinadas por espectrocolorímetro portátil. Três linhas paralelas, separadas por 1,0 mm, foram registradas em cada amostra antes e depois dos procedimentos de imersão para analisar a rugosidade superficial. A resistência à flexão foi medida utilizando um teste de flexão por 3 pontos em uma máquina universal de ensaios com uma célula de carga de 50 kgf e velocidade de 1

mm/min. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre as soluções para cor, rugosidade superficial e resistência à flexão. Os autores concluíram que a imersão em soluções de hipoclorito de sódio, simulando um uso diário de curta duração durante 180 dias, não influenciou a estabilidade de cor, rugosidade superficial e resistência à flexão de resina acrílica polimerizada por microondas.

Em 2009, o estudo de Ribeiro *et al.* teve como objetivo avaliar a efetividade clínica da irradiação por microondas e da terapia fotodinâmica (PDT) para desinfecção de próteses totais superiores. Para os procedimentos de irradiação por microondas, amostras de biofilme das próteses foram coletadas de 30 pacientes, os quais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais com 15 indivíduos cada: Grupo 1 - as próteses foram expostas às microondas durante 3 minutos (650 W), Grupo 2 - as próteses foram expostas às micro-ondas durante 2 minutos (650 W). Para os tratamentos com PDT, amostras de biofilme das próteses foram coletadas de 60 pacientes, os quais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais ($n = 15$ cada): Grupos I e II - as próteses foram borrifadas com 50 mg/L e 100 mg/L do Photogem® em suspensão, respectivamente; Grupos III e IV - as próteses foram tratadas com 50 mg/L e 100 mg/L de Photogem® em gel, respectivamente. Após 30 minutos de pré-irradiação, todas as 60 próteses foram expostas à LED azul com potência de $37,5 \text{ J/cm}^2$ (26 minutos). Amostras das próteses foram obtidas utilizando-se swab estéril antes (nas superfícies do lado esquerdo) e após (nas superfícies do lado direito) a aplicação das microondas e da PDT. Todo o material microbiológico foi diluído e plaqueado em meios seletivos para *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e em meio não-seletivo. Após incubação (48 horas/37°C), o número de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) foi calculado. Os microorganismos que cresceram nos meios seletivos foram identificados utilizando-se métodos bioquímicos antes e após os procedimentos de desinfecção. Os dados obtidos a partir dos experimentos com as microondas foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ($\alpha = 0,05$). Os dados obtidos para os

experimentos de PDT foram submetidos aos testes estatísticos de McNemar e Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). A irradiação por microondas durante 3 minutos (Grupo 1) promoveu a esterilização de todas as próteses avaliadas. Após 2 minutos de exposição às microondas (Grupo 2), uma diminuição significativa para *Candida* spp. ($P = 0,0062$), *Staphylococcus* spp. ($P = 0,0178$), *Streptococcus mutans* ($P = 0,0047$) e para o meio não-seletivo ($P < 0,0001$) foi alcançada quando os valores obtidos foram comparados com os valores de ufc/mL de antes da irradiação. Após a PDT, foi observada esterilização de 40%, 47%, 53% e 60% das próteses, para os grupos I, II, III e IV respectivamente. Quando ocorreu a desinfecção das próteses, os tratamentos de PDT inativaram mais de 90% dos micro-organismos das próteses. O estudo concluiu que a irradiação com microondas por 3 minutos pode ser um método apropriado para prevenir a contaminação cruzada, uma vez que promoveu a esterilização das próteses avaliadas. A PDT mostrou ser um método eficaz para a desinfecção de próteses.

O estudo de Sanitá *et al.*, em 2009, avaliou a efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de próteses totais simuladas contaminadas com cinco diferentes espécies do microorganismo *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) isoladas de culturas padrão e de pacientes HIV positivo. Para isso, próteses totais simuladas foram confeccionadas, esterilizadas por meio de óxido de etileno e individualmente inoculadas com os microorganismos avaliados. Após o período de incubação (48 horas a 37°C), as próteses foram submetidas à irradiação por micro-ondas a 650W durante 3 minutos. Próteses totais não irradiadas foram utilizadas como controle positivo. A seguir, uma alíquota de 25 μ L da solução resultante das diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} foi semeada em placas de Petri em duplicata e todas as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. As colônias foram quantificadas em UFC/mL. Para verificar a efetividade da desinfecção por micro-ondas em longo prazo, as próteses totais irradiadas foram incubadas a 37°C por 7 dias. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pela ANOVA e teste de Tukey (5%). As próteses totais contaminadas com todas as espécies de *Candida* avaliadas demonstraram esterilização após irradiação por micro-ondas durante 3 minutos a 650 W.

Todas as próteses do grupo controle positivo demonstraram crescimento microbiológico após incubação nas placas de Petri. As próteses contaminadas com *C. glabrata* apresentaram valores de UFC/mL significativamente maiores quando comparadas às demais espécies avaliadas, enquanto que as próteses contaminadas com *C. krusei* apresentaram valores de UFC/mL significativamente menores. Ainda, os microorganismos de origem clínica apresentaram valores de UFC/mL significativamente maiores do que os microorganismos padrão. A irradiação por microondas durante 3 minutos a 650 W provou ser um método efetivo para a esterilização de próteses totais contaminadas por diferentes espécies de *Candida* isoladas de pacientes HIV positivo.

Ainda em 2009, o estudo de Dovigo *et al.* avaliou a eficácia da irradiação de microondas na desinfecção de próteses totais simuladas. Foram confeccionadas setenta próteses em procedimento padronizado, submetidas à esterilização por óxido de etileno. As próteses foram individualmente inoculadas (10^{7-8} UFC / mL) com *Staphylococcus aureus* (n = 20), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 20) e *Bacillus subtilis* (n = 30) e incubados por 24 horas a 37°C. Depois disso, 40 próteses foram selecionadas para microondas. Para cada microrganismo, 10 próteses foram submetidas à irradiação de microondas a 650 W por 3 minutos. Além disso, 10 próteses totais contaminadas com *B. subtilis* foram irradiadas por 5 minutos. Trinta próteses não desinfetadas por microondas (n = 10 para cada bactérias) foram utilizadas como controle positivo. Alíquotas idênticas (25 µL) das suspensões foram semeadas em diluições de 10^{-3} a 10^{-6} em placas de meios seletivos apropriados para cada organismo. Após incubação (37 ° C por 48 horas), as colônias foram contadas (ufc / mL). Béqueres de TSB com as próteses levadas ao microondas foram incubadas a 37 ° C por mais 7 dias para verificar a desinfecção de longa duração. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). Não houve evidência de crescimento em 48 horas para as placas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e não era visível turvação nos béqueres de TSB destes espécimes após 7 dias de incubação. Próteses contaminadas com *B. subtilis* e irradiadas por 3 minutos produziu crescimento microbiano em seis placas e turvação em

todos os béqueres de TSB. A desinfecção em microondas por 5 minutos resultou na sobrevivência de *B. subtilis* em duas placas e dois béqueres. O estudo concluiu que a irradiação de microondas por 3 minutos a 650 W produziu esterilização completa das próteses totais contaminadas com *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Próteses contaminadas com *B. subtilis* foram desinfetadas por irradiação de microondas após 3 e 5 minutos a 650 W.

O objetivo do estudo realizado por Mima *et al.*, em 2010, foi avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica (PDT) na inativação de *Candida albicans* em modelo murino de candidose bucal. Setenta e um camundongos fêmeas com seis semanas de idade foram imunossuprimidos com injeções subcutâneas de prednisolona. Tetraciclina foi fornecida na água de beber para promover alteração da microbiota bucal dos camundongos. Os animais foram sedados com injeção de cloridrato de clorpromazina e um *swab* oral embebido em uma suspensão de *C. albicans* (10^7 UFC/mL) foi esfregado na cavidade bucal dos animais. Quatro dias após a inoculação, a PDT foi realizada no dorso lingual utilizando administração tópica de Photogem® a 400, 500 ou 1000 mg/L e, após 30 minutos, iluminação com 305 J/cm² de luz de LED a 455 ou 630 nm. Posteriormente, a quantidade de fungos viáveis foi determinada (UFC/mL) e analisada pelos testes de ANOVA e Holm- Sidak ($P < 0,05$). Os camundongos foram sacrificados, e as línguas foram removidas e processadas para avaliação histológica de presença de fungos e reação inflamatória. A PDT resultou em redução significativa de *C. albicans* recuperada da língua dos camundongos ($P < 0,001$). Não houve diferença entre as concentrações de Photogem® e os comprimentos de onda de LED utilizados. A análise histológica das línguas revelou que a PDT não promoveu efeitos adversos significantes na mucosa local. Os resultados do estudo *in vivo* sugeriram que a PDT pode ser um tratamento alternativo para a candidose bucal.

Dovigo *et al.*, em 2010, realizaram um estudo na tentativa de avaliar a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans* e *C. glabrata*, ATCC e resistente a fluconazol, por meio da utilização do agente fotossensibilizador Photogem® e da iluminação com LEDs de comprimento de onda azul. Inicialmente, os microorganismos avaliados foram inoculados em tubos de

ensaio contendo meio de cultura líquido e incubados *overnight* a 37°C. Em seguida, foram obtidas suspensões celulares das espécies de *Candida* avaliadas. Essas suspensões foram transferidas para placas de 96 orifícios, tratadas com cinco diferentes concentrações de Photogem® (2,5; 5; 10; 25 e 50mg/L) e expostas a quatro doses de luz (10,5; 18; 25,5 e 37,5J/cm²). Suspensões adicionais foram tratadas somente com as cinco concentrações do fotossensibilizador ou apenas com as quatro doses de luz. Cada condição experimental foi realizada três vezes. Após a realização desses experimentos, foram obtidas diluições seriadas de cada amostra (10⁻¹ a 10⁻³), e alíquotas de 25 µL dessas diluições foram plaqueadas, em triplicatas, em Sabouraud Dextrose Agar. Adicionalmente, alíquotas de 25 µL foram removidas das cavidades das placas de orifícios e transferidas diretamente para um quadrante da placa de Petri, sem a realização de diluição. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias viáveis (ufc/mL), e os valores obtidos foram analisados com o teste t de Student (p < 0,05). Os resultados demonstraram que a inativação de *Candida* spp. ocorreu de forma concentração/dose dependente, que resultou na completa inativação desses microorganismos em determinadas condições experimentais. A dose de luz mínima que promoveu a completa inativação das duas origens de *C. albicans* foi 18 J/cm², em associação com 50mg/L de Photogem®. Após a aplicação de 25,5 e 37,5 J/cm², baixas concentrações de fotossensibilizador foram requeridas para a inativação total dessa espécie, sendo que diferenças estatisticamente significante foram apontadas entre os valores obtidos para as duas origens de *C. albicans*. Também foram observadas diferenças estatisticamente significantes na obtenção da inativação total das duas origens de *C. glabrata*. Para a ATCC, não houve crescimento de colônias viáveis após o tratamento com 10, 25 e 50 mg/L de Photogem® seguido de iluminação a 37,5 J/cm². No entanto, somente as concentrações de 25 e 50 mg/L foram capazes de eliminar a *C. glabrata* resistente a fluconazol, nas doses de 25,5 e 37,5 J/cm². Assim, os autores concluíram que a fotoativação do Photogem® pela LED demonstrou efetividade na inativação das duas espécies de *Candida* avaliadas, ATCC e resistente ao fluconazol.

3- PROPOSIÇÃO

O objetivo neste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito da desinfecção por microondas em biofilmes de *Candida* sp. formados em corpos-de-prova de resinas acrílicas Clássico, Onda-Cryl e QC-20.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Obtenção dos corpos-de-prova

Os corpos-de-prova foram confeccionados a partir de 90 matrizes circulares de cera utilidade, medindo 40 mm de diâmetro por 4 mm de altura (Figura 1).



Figura 1 – Matrizes de cera utilidade.

Em seguida, as matrizes de cera foram tradicionalmente incluídas em mufas metálicas (Safrany; Metalurgia Safrany, São Paulo, SP) ou plásticas para microondas (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP) (Figuras 2 e 3) com gesso pedra tipo III (Herodent; Vigodent, Petrópolis, RJ), proporcionado na relação de 100 g de pó para 30 mL de água, espatulado a vácuo (Multivac, Degussa, Alemanha) durante 30 segundos e vazado sob vibração mecânica, para minimizar a ocorrência de porosidade no interior do gesso.



Figura 2 – Mufla metálica.



Figura 3 – Mufla plástica.

As muflas permaneceram em prensa hidráulica de bancada (Delta; Linea Delta, São Paulo, SP) durante a cristalização do gesso, por 1 hora. Dessa forma, pretendia-se evitar que a expansão de presa do gesso pudesse causar desajuste dos encaixes das partes das muflas. Em seguida, foram retiradas da prensa, abertas, imersas em água aquecida por aproximadamente 3 minutos para remoção das matrizes de cera. Os moldes de gesso resultantes foram escovados com solução de detergente doméstico (Ype, Química Amparo, Amparo, SP) de água aquecida para remoção dos vestígios de cera e de vaselina usada como isolante do gesso e lavados com água aquecida. Os moldes de gesso foram recobertos com uma camada de silicone laboratorial (Zetalabor, Zhermack) (Figura 4) e um disco de resina medindo 20 mm de diâmetro por 2 mm de altura foi pressionado para formar o molde de silicone, no qual os corpos-de-prova foram confeccionados. As superfícies do gesso de inclusão foram isoladas com isolante à base de alginato de sódio (Cel-lac, SS White, Rio de Janeiro, RJ) antes da prensagem da resina acrílica.

Foram confeccionados 30 corpos-de-prova para cada tipo de resina acrílica (o experimento foi realizado em duplicata, ou seja, todo o procedimento foi realizado duas vezes em dias distintos), conforme informações apresentadas no Quadro 1.



Figura 4 – Molde de silicone laboratorial.

Quadro 1 – Resinas acrílicas utilizadas no estudo.

MATERIAL	NOME COMERCIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO/ LOTE
Resina acrílica Convencional Termicamente ativada	Clássico	Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP	Copolímero de Poli-metilmetacrilato Lote pó- 900170 Lote líquido- 200208
Resina acrílica Convencional	QC-20	Dentsply Ind. Com. Ltda. Petrópolis, RJ	Copolímero de metil-n-butil metacrilato Lote pó- 622196 Lote líquido- 580313
Resina acrílica para microondas	Onda Ceryl	Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP	Copolímero de Poli-metilmetacrilato e etileno glicometacrilato Lote pó- 895091 Lote líquido- 300408

A relação volumétrica polímero/monômero foi utilizada conforme recomendações dos fabricantes: Clássico e Onda-Ceryl, de 21 g de polímero para 7 mL de monômero; QC-20, de 23 g de polímero para 10 mL de monômero. Cada resina foi manipulada em pote de vidro com tampa (Jon Comércio de Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP) até atingir a fase plástica, quando foi homogeneizada manualmente, inserida nos moldes de silicone, recoberta com celofane umedecido com água e prensada em prensa hidráulica de bancada (Delta; Linea Delta, São Paulo, SP).

A prensagem inicial das resinas Clássico e QC-20 em muflas metálicas (Safrany) foi de forma lenta e gradual para extravasar o excesso de material (Figura 5). Após a abertura das muflas, o celofane foi removido e os excessos de resina retirados com instrumento cortante Le Cron (Figura 6). A

prensagem final foi de 1.250 kgf por 30 minutos. De modo similar, a prensagem inicial da resina incluída em mufla plástica foi de 850 kgf por 5 minutos e a final de 950 kgf por 30 minutos.

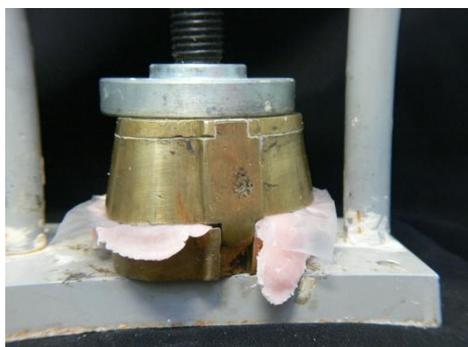


Figura 5 - Prensagem da resina para eliminação do excesso.



Figura 6 - Remoção dos excessos de resina.

A polimerização da resina convencional Clássico foi em polimerizadora automática (Termotron; Termotron Indústria de Produtos Odontológicos, Piracicaba, SP), regulada para o ciclo longo em água aquecida a 74°C por 9 horas (Figura 7). A resina para microondas Onda-Cryl foi polimerizada em forno de microondas doméstico (Continental; Continental Ind. e Com., Manaus, AM), com 900 W e ciclo de polimerização de: 1- 40% da potência por 3 minutos; 2- 0% da potência por 4 minutos e 3- 90% da potência por 3 minutos (Figura 7); e QC-20, em água em ebulição por 20 minutos, como recomendado pelo fabricante.



Figura 7 - Polimerizadora automática.



Figura 8 - Forno de microondas.

A demuflagem dos corpos-de-prova (Figura 9) foi feita depois do esfriamento das muflas em temperatura ambiente sobre a bancada do Laboratório de Prótese Total da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP. Depois da remoção das irregularidades grosseiras com broca Maxi Cult (Meillefer, Rio de Janeiro, RJ), em baixa rotação, o acabamento foi feito com pedras abrasivas para resina (Trimers, Schelble Indústria de Pontas Abrasivas, Petrópolis, RJ).



Figura 9 – Demuflagem dos corpos-de-prova.

4. 2 - Esterilização dos corpos-de-prova

Após o acabamento, os corpos-de-prova foram esterilizados com óxido de etileno (ACECIL – Central de Esterilização e Ind. Ltda., Campinas, São Paulo). Os corpos-de-prova esterilizados (Figura 10) foram manipulados até 15 dias após a esterilização, considerando que ultrapassando este período a esterilização estaria comprometida devido ao prazo de validade.



Figura 10 - Corpos-de-prova esterilizados com óxido de etileno.

4. 3 - Obtenção do inóculo para contaminação dos corpos-de-prova

4.3.1 - Amostras de leveduras

Os isolados de *Candida* sp. (Figura 11) selecionados para a contaminação dos corpos-de-prova foram obtidos junto ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. Para o preparo dos inóculos foram utilizados os seguintes microorganismos: *C. albicans* ATCC 90028, *C. dubliniensis* ATCC 7987 e *C. tropicalis* ATCC 4563.



Figura 11 - Isolado de *Candida Albicans* utilizado no preparo do inóculo.

Antes de iniciar o experimento, câmara de fluxo laminar vertical foi preparada para permitir um ambiente asséptico para a manipulação dos falcons, *ependorfs* e placas de Petri. Para isso, a porta de vidro da câmara de fluxo laminar foi fechada e a luz ultravioleta foi acionada por 10 minutos. Após

esse período, a luz ultravioleta foi desligada e o ventilador da câmara de fluxo laminar foi acionado para aclimatização do ambiente. Esta medida se repetiu durante todas as etapas subseqüentes do experimento.

Os isolados de *Candida* sp. foram mantidos por repiques sucessivos em tubos com Ágar-Sabouraud-Dextrose (ASDC, Himedia M063 – 500g) acrescido de cloranfenicol (50 mg/L, ASDC). Tais isolados foram semeados em placas com ASDC e incubados a 37°C por 48 horas. Colônias isoladas foram repicadas das placas com ASDC em 10mL de caldo Sabouraud dextrose (Difco) presente em tubos falcons estéreis (um falcon identificado para cada espécie de *Candida*). Estes tubos foram colocados em agitador mecânico de tubos (AP 56 – Phoenix) e agitados vigorosamente. Pipetou-se do tubo falcon 500 µL da mistura de caldo Sabouraud dextrose e o inóculo da levedura em cubeta de quartzo e mediu-se, através do espectrofotômetro (Genesys 10 UV), a densidade óptica. Este aparelho tem a função de medir e comparar a quantidade de luz (energia radiante) absorvida pela amostra do meio de cultura isolado e, posteriormente, a concentração de *Candida* no caldo Sabouraud dextrose. Ou seja, ele foi usado para medir (identificar e determinar) a concentração da amostra do inóculo que absorve energia radiante. Realizada a leitura no espectrofotômetro (Figuras 12 e 13), a densidade óptica do inóculo foi 0,8 UFC/mL. Esse procedimento foi realizado para a padronização do inóculo por meio da contagem de células leveduriformes (aproximadamente 10^8 UFC/mL).



Figura 12 - Espectrofotômetro.



Figura 13 - Vista interna do espectrofotômetro.

A seguir, três grupos principais foram obtidos: I - resina irradiada (grupo experimental) em triplicata, II - resina não irradiada (controle positivo) e

III - resina sem contaminação. Cada um desses grupos foi dividido em 3 subgrupos: 1) corpos-de-prova inoculados por *C. albicans* (A); 2) corpos-de-prova inoculados por *C. dubliniensis* (D) e 3) corpos de- prova inoculados por *C. tropicalis* (T).

4.3.2 - Formação do Biofilme

A assepsia das mãos do operador foi feita com álcool 70% (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda., São Jose do Rio Preto, SP). No interior da câmara de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP), cada corpo-de-prova foi retirado do envelope de esterilização de óxido de etileno (ACECIL) com pinça estéril e colocado em placas plásticas estéreis. Os corpos-de-prova foram posicionados com a face não polida voltada para cima, no interior de placas plásticas estéreis de 6 poços para cultura de células. Foram utilizadas 6 placas para o total de 36 corpos-de-prova, sendo cada poço devidamente identificado com anotações feitas com caneta para retroprojeter, identificando o tipo de resina e a espécie de *Candida*.

Uma suspensão de 200 µL do inóculo obtido (10^8 leveduras/mL) foi depositada sobre os corpos-de-prova e deixados por 180 minutos (tempo de adesão do microorganismo). Decorrido esse tempo, caldo de cultura Sabouraud dextrose foi vertido em cada poço até cobrir totalmente cada corpo-de-prova (Figura 14). O conjunto foi incubado a 37°C em aerobiose por 24 horas para formação do biofilme (Figura 15).

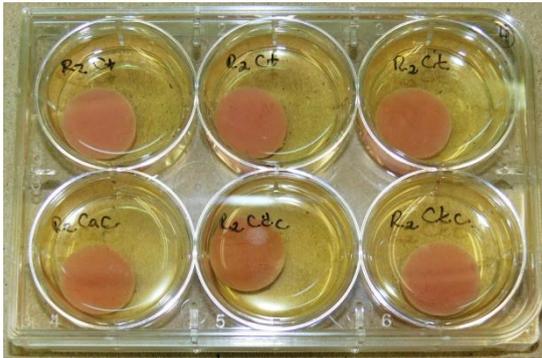


Figura 14 - Placas plásticas com 6 poços contendo os corpos-de-prova contaminados em caldo Sabouraud dextrose.

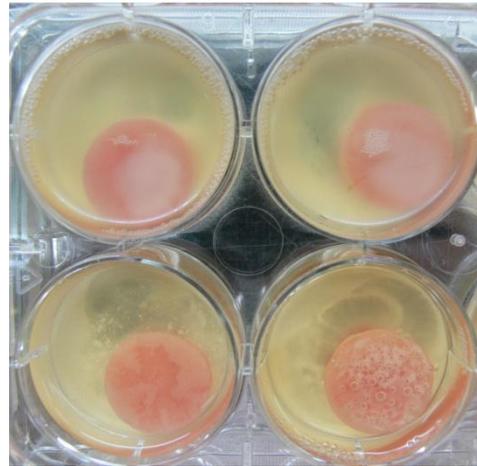


Figura 15 - Biofilme formado após incubação.

Após o crescimento do biofilme foi realizada a desinfecção por microondas com potência de 650 W durante 3 minutos, em cada corpo-de-prova, sendo que o controle positivo (com microorganismo) e o controle negativo (sem microorganismo) não foram submetidos à desinfecção por microondas. O procedimento foi realizado em cada um dos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 – *Candida albicans*: quinze corpos-de-prova foram deixados em cultura com *Candida albicans* (cinco corpos-de-prova para cada resina, sendo triplicatas, um controle cheio e um controle sem microorganismos) por 24 horas para o crescimento do biofilme.

Grupo 2 - *Candida dubliniensis*: quinze corpos-de-prova foram deixados em cultura com *Candida dubliniensis* (cinco corpos-de-prova para cada resina, sendo triplicatas, um controle cheio e um controle sem microorganismos) por 24 horas para o crescimento do biofilme.

Grupo 3 – *Candida tropicalis*: quinze corpos-de-prova foram deixados em cultura com *Candida tropicalis* (cinco corpos-de-prova para cada resina, sendo triplicatas, um controle cheio e um controle sem microorganismos) por 24 horas para o crescimento do biofilme.

4. 4 - Descontaminação e desinfecção dos corpos-de-prova

Após o período de incubação, os corpos-de-prova foram removidos dos poços das placas plásticas contendo os meios de cultura e imersos individualmente num béquer estéril contendo 10 mL de água destilada estéril. Em seguida, cada béquer foi posicionado no prato giratório do forno de microondas (Continental; Continental Ind. e Com., Manaus, AM) e irradiado a 650 W por 3 minutos (Figuras 16 e 17). Após a irradiação, cada corpo-de-prova foi assepticamente removido do béquer e colocado em tubo falcon contendo 5 mL de solução salina estéril e cinco pérolas de vidro estéreis, o qual foi vigorosamente agitado num agitador de tubos (AP 56 – Phoenix) (Figura 18) por 1 minuto, deixado em repouso por 9 minutos e novamente agitado para desprender células microbianas da superfície do corpo-de-prova para a solução resultante.



Figura 16 – Becker no prato giratório



Figura 17 – Forno de microondas.

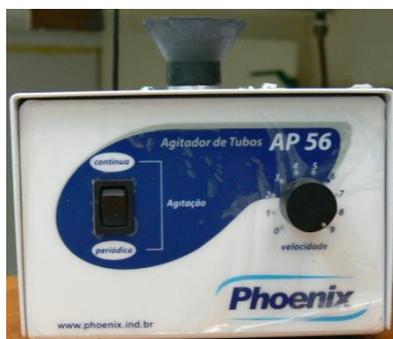


Figura 18 – Agitador de tubos.

O processo de diluição seriada foi realizado por meio da transferência de uma alíquota de 100 µL da solução do tubo falcon contendo um corpo-de-prova em 900 µL de solução salina, para um *ependorf* contendo 900 µL da mesma solução. O conteúdo do *ependorf* foi agitado vigorosamente com auxílio da pipeta por 1 minuto e uma nova alíquota de 100 µL foi removida e colocada em outro *ependorf* contendo 900 µL dessa solução. Esse procedimento foi realizado seis vezes para cada corpo-de-prova irradiado e nove vezes para cada corpo-de-prova não irradiado (grupos controle). Com o objetivo de permitir a contagem das unidades formadoras de colônia, as diluições seriadas foram de 10^{-1} a 10^{-6} para os grupos experimentais e de 10^{-1} a 10^{-9} para os grupos controles. Uma alíquota de 100 µL de cada uma dessas diluições foi semeada numa placa de Petri contendo ASDC. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura de cada placa. Os procedimentos de semeadura foram realizados em triplicatas, para os corpos-de-prova irradiados. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para crescimento e posterior contagem das colônias viáveis.

4.5 - Contagem de microorganismos

Após a incubação de 48 horas a 37°C, as placas das amostras irradiadas (Figura 19) e não irradiadas (Figura 20) foram submetidas à contagem de colônias em contador de colônias digital (Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP). As placas foram posicionadas sobre o contador digital de colônia e aquelas que apresentavam valores entre 30 e 300 foram selecionadas. A seguir, a ponta do contador foi posicionada individualmente sobre cada uma das colônias formadas para realização da contagem. Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foram calculados e comparados. Para determinar a efetividade das microondas na desinfecção dos corpos-de-prova foi necessário calcular o número de microorganismos viáveis, em valores de UFC/mL, obtido com e sem o procedimento de desinfecção pela irradiação por microondas.

Após a obtenção desse valor em cada duplicata, o número de UFC/mL foi calculado.

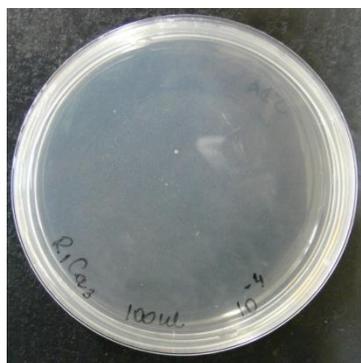


Figura 19 - Ausência de crescimento de microorganismo após desinfecção.

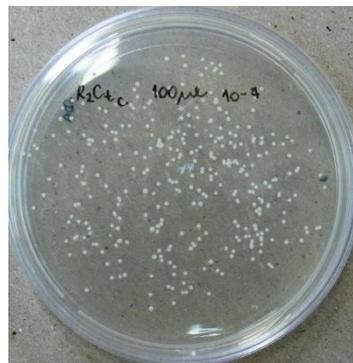


Figura 20 Crescimento de *Candida tropicalis* no grupo controle.

4.6– Planejamento estatístico

No presente estudo foram verificados os fatores com e sem desinfecção (grupo experimental e controle, respectivamente). Para cada variável foram planejadas repetições em duplicatas.

Para determinar a efetividade das microondas na desinfecção dos corpos-de-prova de resina foi necessário calcular o número de microorganismos viáveis (UFC/mL), obtido com e sem o procedimento de desinfecção pela irradiação de microondas. Para cada duplicata, a contagem do número de colônias foi realizada para cada uma das diluições semeadas. Foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido, para cada microorganismo, o número de colônias referente a uma diluição que representasse o valor entre a variação considerada. Após a obtenção desse valor em cada duplicata, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado. Para esse cálculo, utilizou-se a fórmula a seguir:

Número de colônias X 10ⁿ

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (1 a 6) e que equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição semeada nas placas. Neste estudo, q = 0,1 considerando que foram pipetados 100 µL para cada diluição. Os valores de UFC/mL obtidos foram deixados em notação científica e foi obtida a média aritmética dos valores das duplicatas de cada amostra.

Os valores de UFC/mL encontrados após os cálculos foram extremamente elevados e, esse fato, não garantiu a validade da aplicação de procedimentos estatísticos paramétricos na avaliação da desinfecção por microondas de biofilmes de *Candida* aderidos à resina acrílica. Para esse fim foram utilizados métodos não paramétricos de análise de dados.

O método estatístico empregado foi Kruskal-Wallis, pelo qual são avaliados os postos médios das contagens de microorganismos em cada um dos grupos controle e experimental. Em seguida foram aplicadas comparações múltiplas não-paramétricas dos postos médios dois a dois pelo teste de Student-Newman-Keuls. Adotou-se o nível de 5% de significância como regra de decisão para aceitar como significativa a diferença entre postos médios.

5 – RESULTADOS

Na Tabela 1 estão representados os valores originais das médias das duplicatas em UFC/mL, relativas aos corpos-de-prova dos grupos experimental e controle.

Tabela 1 - Média (desvio padrão) das UFC/mL em resinas acrílicas contaminadas com biofilmes de *Candida* e submetidas à desinfecção por microondas.

	Resina Acrílica	<i>Albicans</i>	<i>Dubliniensis</i>	<i>Tropicalis</i>
Controle	Clássico	6,45 x 10 ⁷ (6,80 x 10 ⁷) a,A	762,50 x 10 ⁷ (816,70 x 10 ⁷) a,A*	162,00 x 10 ⁷ (24,04 x 10 ⁷) a,A*
	Onda Cryl	62,05 x 10 ⁷ (69,22 x 10 ⁷) a,A	7,70 x 10 ⁷ (8,90 x 10 ⁷) a,A	71,50 x 10 ⁷ (41,71 x 10 ⁷) a,A*
	Q C - 20	19,75 x 10 ⁷ (7,28 x 10 ⁷) a,A	9,30 x 10 ⁷ (5,37 x 10 ⁷) a,A*	47,95 x 10 ⁷ (46,73 x 10 ⁷) a,A*
Desinfecção	Clássico	0 (0) a,A	0 (0) a,A	0 (0) a,A
	Onda Cryl	0,16 x 10 ⁷ (0,23 x 10 ⁷) a,A	0 (0) a,A	0,19 x 10 ⁷ (0,02 x 10 ⁷) a,A
	Q C - 20	0 (0) a,A	0 (0) a,A	0,06 x 10 ⁷ (0,04 x 10 ⁷) a,A

Médias seguidas de letras distintas representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas (linhas) comparam espécies de *Candida* na mesma resina e tratamento (Kruskal-Wallis). Letras maiúsculas (colunas) comparam a mesma espécie de *Candida* no mesmo tratamento em diferentes resinas (Kruskal-Wallis). Asteriscos (*) comparam os tratamentos na mesma espécie de *Candida* e resina (Kruskal-Wallis/ Student-Newman-Keuls).

As sementeiras relativas aos corpos-de-prova irradiados com microondas (grupo experimental) apresentaram diminuição no número de colônias viáveis para todos os biofilmes formados pelas espécies de *Candida* analisadas. A diminuição foi observada nos três tipos de resina acrílica utilizadas no presente estudo. Os resultados demonstraram efetiva esterilização do biofilme de *Candida* após 3 minutos de irradiação a 650 W, para a maioria dos corpos-de-prova; porém, a completa esterilização não ocorreu para a totalidade dos grupos desinfetados.

Os corpos-de-prova relativos ao grupo controle (não irradiados) apresentaram crescimento microbiano após 48 horas de incubação a 37°C. Os corpos-de-prova relativos ao grupo controle sem contaminação e sem desinfecção também não apresentaram crescimento microbiano após incubação.

6 – DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da desinfecção por microondas em biofilmes de *Candida* sp (*C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*) formados em corpos-de-prova de resinas acrílicas (Clássico, Onda-Cryl e QC-20). Ficou constatado que os grupos não irradiados apresentaram crescimento microbiano após 48 horas de incubação a 37°C. A irradiação por microondas foi efetiva para esterilização de resinas acrílicas contaminadas com biofilme de *C. dubliniensis* (Valores estatisticamente significantes, $p \leq 0,05$). Porém, não demonstrou ser efetiva na esterilização da resina acrílica para microondas contaminada com biofilmes *C. albicans* e *C. tropicalis*, nem para a resina polimerizada por água em ebulição contaminada com biofilme de *C. tropicalis* (Valores estatisticamente significantes, $p \leq 0,05$).

O grupo experimental apresentou diminuição significativa no número de colônias viáveis para todos os biofilmes formados pelas espécies de *Candida* analisadas. Assim, os resultados demonstraram efetiva esterilização do biofilme de *Candida* após irradiação a 650 W por 3 minutos, para a maioria dos corpos-de-prova (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com alguns estudos prévios que também verificaram que a irradiação por microondas foi efetiva na desinfecção e esterilização de próteses dentárias, resinas rígidas e resilientes para reembasamento imediato e instrumentos odontológicos (Olsen, 1965; Rohrer & Bulard, 1985; Rosaspina *et al.*, 1994; Baysan *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 1998; Dixon *et al.*, 1999; Neppelenbroek *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006; Mima *et al.*, 2007).

A esterilização de próteses contaminadas com *C. albicans* parece contribuir na prevenção da estomatite protética. Um exemplo é o estudo de Ribeiro *et al.*, em 2009, que avaliou a efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de próteses totais superiores contaminadas com *C. albicans*, verificando que a potência de 650 W por 3 minutos resultava na esterilização de todas as próteses avaliadas. Esse resultado foi baseado na ausência de crescimento microbiológico nos meios de cultura seletivos e não-seletivos, após 48 horas. Em nosso trabalho é possível que não tenha ocorrido completa esterilização de todos os corpos-de-prova, por se tratar da desinfecção de

biofilme de *Candida* e não de cepas isoladas deste microorganismo, como tem ocorrido na maioria dos trabalhos presentes na literatura (Molinari & Runnells, 1991; Border & Rice-Sperman, 1999; Silva *et al.*, 2006; Sanitá *et al.*, 2009).

De acordo com Chandra *et al.*, células associadas ao biofilme apresentaram resistência aos antifúngicos químicos mais frequentemente utilizados para o tratamento de estomatite protética, o que reforça a suposição que a energia de microondas constitui opção eficaz na desinfecção de biofilmes de *Candida* em resinas acrílicas para base de próteses.

O estudo *in vitro* realizado por Sanitá constatou esterilização de todas as próteses totais contaminadas por diferentes espécies de microorganismo *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida dubliniensis*), isoladas de culturas padrão e de pacientes HIV positivo, após irradiação por microondas a 650 W por 3 minutos. Essa efetiva desinfecção de microorganismos, independente da espécie de *Candida* avaliada naquele estudo, concorda com os resultados do presente estudo que promoveu a esterilização do biofilme de *C. dubliniensis* em todas as resinas acrílicas (Clássico, Onda Cryl e QC-20) e a desinfecção efetiva dos biofilmes de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Além disso, os resultados da investigação *in vitro* de Dovigo *et al.* demonstraram que irradiação de 650 W por 3 minutos também foi efetiva na esterilização de próteses contaminadas com as espécies bacterianas *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Alguns estudos mencionados na literatura (Dixon *et al.*, 1999; Campanha *et al.*, 2005; Mima *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2006) recomendam que durante a irradiação as amostras contaminadas sejam imersas em água, indicando que a ação sobre os patógenos pode ser puramente térmica. Independente do mecanismo de ação das microondas sobre os microorganismos, existe o conceito que o efeito de inativação ou lise celular ocorre, principalmente, na presença de água (Rosaspina *et al.* 1994; Dixon *et al.*, 1999). Organismos liofilizados ou secos são dificilmente comprometidos na desinfecção, inclusive quando submetidos às exposições prolongadas, indicando que o líquido no qual as amostras são imersas seria fator importante na absorção da energia.

Baysan *et al.* avaliaram diferentes métodos de desinfecção para resinas reembasadoras resilientes contaminadas com *C. albicans* ou *S. aureus*

e constataram que a imersão, por 5 horas, em solução de hipoclorito de sódio, foi mais efetiva que a irradiação por microondas a 650 W durante 5 minutos de amostras a seco, não sendo o procedimento de desinfecção mais adequado para eliminar os microorganismos.

Os resultados do presente estudo sobre a efetividade da desinfecção por microondas em biofilmes de *Candida* aderidos às resinas acrílicas termicamente ativada concorda com o estudo de He *et al.* quando comparou a adesão de cepas isoladas de espécies de *Candida* a materiais autopolimerizável e termopolimerizável para bases de próteses. Esses autores verificaram que a aderência de *Candida* aos materiais resinosos dependia da qualidade de resina utilizada. Além disso, foi observado que, em geral, menor número de células aderiu às resinas termopolimerizáveis em comparação às resinas autopolimerizáveis.

No presente estudo foram encontrados valores estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) para a desinfecção de biofilmes de *C. tropicalis* para as resinas termopolimerizáveis Clássico, Onda Ceryl e QC-20 e de *C. dubliniensis* para as resinas Clássico e QC-20. Com base nesse resultado, pode-se deduzir que, apesar do estudo analisar biofilme de *Candida* ao invés de cepas isoladas, o fato de as resinas estudadas não serem autopolimerizáveis deve ter contribuído para a efetividade da desinfecção.

Os métodos de desinfecção de próteses têm a finalidade de eliminar os microorganismos patogênicos sem, porém, causar efeitos adversos sobre as propriedades físicas e mecânicas de resinas acrílicas. Dixon *et al.* relataram que a exposição às microondas durante 5 minutos não causou alterações significantes na dureza de um material reembasador resiliente e de uma resina autopolimerizável para base de prótese. Por outro lado, Pavarina *et al.* investigaram o efeito da desinfecção por microondas (650 W/6 minutos) na resistência à flexão de 5 resinas rígidas para reembasamento e uma resina para base de prótese. Os autores observaram que somente um material reembasador apresentou menor resistência à flexão depois da desinfecção por microondas. Da mesma forma, ao avaliar o efeito da desinfecção por microondas a 650 W durante 6 minutos, Ribeiro verificou que as propriedades mecânicas de resistência à flexão e dureza de 4 resinas para reembasamento e uma resina termopolimerizável não foram alteradas. Assim, é possível supor

que o método de desinfecção utilizado neste estudo (650 W por 3 minutos), além de efetivo, não deve, provavelmente, resultar em efeitos deletérios nas propriedades mecânicas das resinas para próteses totais.

Entretanto, novos estudos deveriam ser realizados para analisar o efeito de sucessivas desinfecções por microondas em biofilmes de *Candida* infestando tipos diferentes de resinas acrílicas, para avaliar possíveis alterações de suas propriedades mecânicas. Reforçando essa suposição, o estudo de Campos *et al.* mostrou efeito cumulativo promovido por dois protocolos de desinfecção por energia de microondas na rugosidade superficial e adaptação de bases de próteses totais confeccionadas com resinas polimerizadas por microondas e em água em ebulição. Na rugosidade houve interação significativa entre tipo de resina e técnica de polimerização, desinfecção e número de procedimentos de desinfecção. A resina polimerizada por microondas mostrou maior alteração de rugosidade e nível de adaptação que por ebulição.

Considerando os resultados obtidos nesta investigação, é possível sugerir que o protocolo de 650 W por 3 minutos seria adequado tanto para promover a inativação dos microorganismos encontrados nas próteses como também para não causar efeitos adversos nas propriedades mecânicas das resinas acrílicas.

A maioria dos corpos-de-prova de resinas acrílicas contaminados com biofilme de *Candida sp.* foi efetivamente esterilizado pela irradiação por microondas a 650 W por 3 minutos de exposição. A inativação de biofilmes de diferentes espécies de leveduras, utilizando o forno de microondas doméstico, estaria diretamente relacionada à espécie do microorganismo e do material a ser esterilizado, assim como ao tempo de exposição e à intensidade (potência), dificultando a padronização do procedimento proposto. A maioria dos estudos da literatura relata esterilização com microondas para cepas isoladas de *Candida sp.*, diferindo do presente estudo que investigou desinfecção de biofilme de *Candida sp.* Dessa maneira, diferentes potências, períodos e frequência de irradiação devem ser, futuramente, avaliados para identificar a relação tempo-potência ideal para desinfecção de biofilmes formados por *Candida sp.*

Avaliações clínicas do efeito da desinfecção por microondas sobre a retenção e estabilidade da base de prótese são também necessárias. Investigações deveriam ser feitas a respeito dos efeitos em longo prazo desta técnica de esterilização na dureza e rugosidade de resinas acrílicas utilizadas na confecção de próteses total e parcial removíveis. Embora haja necessidade de futuras investigações confirmativas, os resultados do presente estudo e da literatura especializada indicam que a desinfecção de próteses por microondas parece ser método promissor na prevenção de contaminação.

7 – CONCLUSÃO

Com base nos resultados analisados e discutidos foi possível emitir a seguinte conclusão:

Os resultados deste estudo demonstraram que a irradiação por microondas a 650 W por 3 minutos foi efetiva para desinfecção, independente da resina acrílica e da espécie de *Candida* formadora do biofilme.

REFERÊNCIAS*

Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers. J. Prosthet. Dent. 1981; 45(4): 376-9.

Andrade IPB, Junqueira JC, Faria IS, Santos SSF, Rego MA, Jorge AOC. Efeitos do vinagre sobre *Candida albicans* aderidas *in vitro* em resina acrílica termicamente ativada. Cienc. Odontol. Bras. 2008; 11(1): 91-8.

Akpan A, Morgan R. Oral Candidiasis. Postgrad. Med. J. 2002; 78(922): 455-9.

Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. Br. Dent. J. 1979; 147(10): 267-72.

Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. J. Prosthet. Dent. 1992; 68(1): 191-95.

Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effects of various disinfectant solutions on the surface hardness of an acrylic resins denture base material. Int. J. Prosthodont. 1993; 6(1): 9-12.

Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, Koninck L, Avon SL, Lalonde B *et al.* Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. Oral Surg. Oral Med. Pathol. Oral Radiol. Endod. 2003; 95: 51-9.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Baysan, A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *staphylococcus aureus*. J. Prosthet. Dent. 1998; 79(4): 454-58.

Border BG, Rice-Sperman L. Microwaves in the laboratory: effective decontamination. Clin. Lab. Sci. 1999; 12(3): 156-60.

Budtz-Jørgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in treatment of *Candida* associated denture stomatitis. Antimicrob. Agents Chemoter. 1988; 32(12): 1859-63.

Budtz-jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. Acta Odontol. Scand. 1990; 48(1): 61-69.

Budtz-Jørgensen E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. Acta Odontol. Scand. 1990; 48(1): 37-43.

Brace ML,Plummer KD. Pratical denture disinfection. J. Prosthet. Dent. 1993; 70(6): 538-54.

Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. J. Prosthet. Dent. 2005; 93(5): 483-87.

Campos MAP, Kochenborger C, Silva DFF, Teixeira, ER, Shinkai, RSA. Effect of repeated microwave disinfection on surface roughness and baseplate adaptation of denture resins polymerized by different techniques. Rev. Odonto. Cienc. 2009; 24(1): 40-4.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddou FF, Houyer LL, Douglas LJ *et al*. Antifungal Resistance of Candidal Biofilms formed on denture acrylic in vitro. J. Dent. Res. 2001; 80(3): 903-08.

Coelho CM, Sousa YT, Dare AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. J. Oral. Rehabil. 2004; 31(2): 135-39.

Compagnoni MA, Nogueira SS, Russi S, Lombardo JG, Ferreira PCP. Influência da união previa dos dentes artificiais na confecção das próteses totais. Revista da APCD. 1993; 47(4):

Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB *et al.* Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo d 100 pacientes com candidiases superficiais. Ass. Bras. Dermatol. 2004; 79(6): 689-97.

Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. Br. Dent. 1970; 129(4): 151-56.

Dixon DL, Breeding L, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. J. Prosthet.Dent.1999; 81(2): 207-14.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Adriano CS, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogem®.Braz. j. microbiol. 2010; 41(1): 42-49.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Oliveira JA, Vergani CE, Machado AL. Microwave disinfection of complete dentures contaminated in vitro with selected bacteria. J Prosthodont. 2009 18(7): 611-7.

Fotos PG, Vicent SD, Hellstein, JW. Oral Candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1992; 74(1): 41-49.

Goodson LB, Glass RT, Bullard JW, Conrad RS. A statistical comparison of denture sanitation using a commercially available denture cleaner with and without microwaving. Gen. Dent. 2003; 51(2): 148-51.

He XY, Meurman, JH, Kari, K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses*. 2006; 49: 80-4.

Iacopino AM, Wathen HF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J. Am. Dent. Assoc.* 1992; 123(1): 46-51.

Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur. J. Prosthodont. Restor. Dent.* 1993; 2(1): 17-22.

Love WD, Goska FA, Mixson R. The etiology of mucosal inflammation associated with dentures. *J. Prosthet. Dent.* 1967; 18(6): 515-27.

Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DMP, Machado. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside relines resin. *J. Of Prosthodontist.* 2007; 20: 1-6.

Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CAS, Kurashi C et.al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(3): 392-4.

Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfectants in infection control. *Dent. Clin. North Am.* 1991; 35(2): 323-371.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside relines resins. *Int. J. Prosthodont.* 2003; 16(6): 616-20.

Newton AV. Denture sore mouth as possible etiology. *Br. Dental J.* 1962; 112: 357-60.

Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Kumagai H, Samaranayake LP. Effects of dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycopathologia*. 1997; 139(2): 87-91.

Novais PMR, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Jorge JH. The occurrence of porosity in relines acrylic resins. Effect of microwave disinfection. *Gerodontology*. 2009; 26(1): 65-71.

Olsen CM. Microwaves inhibit bread mold. *Food. Eng.* 1965; 37: 51-53.

Olsen I, Stenderup A. Clinical-mycological diagnosis of oral yeast infections. *Acta Odontol. Scand.* 1990; 48(1): 11-18.

Paranhos HFO, Davi LR, Peracini A, Soares RB, Lovato CHS, Souza RF. Comparison of physical and mechanical properties of microwave-polymerized acrylic resin after disinfection in sodium hypochlorite solutions. *Braz Dent J.* 2009; 20(4): 331-35.

Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Guinesi AS, Vergani CE, Machado AL, Giampaolo ET. Effect of microwave disinfection on the flexural strength of hard chairside reline resins. *J. Dent., Kindlington, v.33, p.741- 748, Oct. 2005.*

Pavarina AC, Pizzolitto, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solution to reduce the microbial growth. *J. Oral Rehabil.* 2003; 30: 532-36.

Pires FR, Santos BD, Bonan PFR, Almeida OP, Lopes MA. Denture Stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J. Oral Rehabil.* 2002; 29(11): 115-19.

Requa-Clark B. Council on dental materials, instruments, and equipment. *JADA.* 1983; 106: 77-79.

Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Spolidorio DMP, Giampaolo ET,

Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. *J Dent.* 2009; 37(9): 666-672.

Ribeiro RC, Giampaolo ET, Machado AL, Vegani CE, Pavarina A. Effect of microwave disinfection on the bond strength of denture teeth to acrylic resins. *Int. J. of Adhesion & Adhesives.* 2008; 38: 296-301.

Ritchie GM, Fletcher AM, Main DM, Prophet AS. The etiology, exfoliative cytology, and treatment of denture stomatitis. *J. Prosthet. Dent.* 1969; 22(2): 185-200.

Rohrer MD, Bulard, RA. Microwave sterilization. *J. Am. Dent. Assoc.* 1985; 110(2): 194-98.

Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios.* 1994; 78(314): 55-59.

Sanitá PV, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Machado AL. Growth of *Candida* species on complete dentures: effect of microwave disinfection. *Mycoses.* 2009; 52(2): 154-160.

Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int. J. Prosth.* 2006; 19(3): 288-293.

Tony A, Samaranayake LP, Reichart PA, Olsen I. A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Sug. Oral Med. Oral Pathol.* 1997; 84(2): 111-12.

Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M *et. al.* Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. *Oral Sug. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2002; 93(2): 149-154.

Wanke B, Lazera MS, Nucci M. Fungal infections in the immunocompromised host. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000; 95(1): 153-158.

Webb BC, Thomas CJ, Harty TWS, Willcox MDP. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J. Oral Rehabil.* 1998; 25(6): 416-423.

Wilson J. The etiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br. Dent. J.* 1998; 185(8): 308-384.