

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

JANAINA CÂNCIO DE HOLANDA PRADO

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR UM NOVO DISPOSITIVO DE
LUZ COMPARADA A COMPOSTOS QUÍMICOS INDICADOS PARA
DESCONTAMINAÇÃO DA RESINA ACRÍLICA**

FORTALEZA

2015

JANAINA CÂNCIO DE HOLANDA PRADO

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR UM NOVO DISPOSITIVO DE
LUZ COMPARADA A COMPOSTOS QUÍMICOS INDICADOS PARA
DESCONTAMINAÇÃO DA RESINA ACRÍLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Matthes de Freitas Pontes.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

- P917e Prado, Janaína Câncio de Holanda.
Efeitos da terapia fotodinâmica mediada por um novo dispositivo de luz comparada a compostos químicos indicados para descontaminação da resina acrílica/ Janaína Câncio de Holanda Prado. – 2015.
77 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2015.
Área de concentração: Clínica Odontológica.
Orientação: Prof. Dr. Karina Matthes de Freitas Pontes.
1. Fotoquimioterapia. 2. Resinas Acrílicas. 3. Desinfecção. 4. Prótese Dentária. I.
Título.
-

CDD 617.69

JANAINA CÂNCIO DE HOLANDA PRADO

EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR UM NOVO DISPOSITIVO DE
LUZ COMPARADA A COMPOSTOS QUÍMICOS INDICADOS PARA DESCONTAMINAÇÃO
DA RESINA ACRÍLICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em 08/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karina Matthes de Freitas Pontes (Orientadora)
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – UFC

Prof. Dr. Rômulo Rocha Regis
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – UFC

Prof. Dr. Marcelo Barbosa Ramos
Curso de Odontologia – UNIFOR

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela fé, por estar presente em todos os momentos da minha caminhada, por me guiar em minhas escolhas e decisões.

À minha mãe **Maria Cleires**, sempre presente mesmo que distante dos meus olhos, obrigada pelos princípios de vida, pelo amor e carinho que me destes em vida, obrigada por acreditar e apoiar as minhas escolhas, principalmente a profissional, sei que deve estar orgulhosa por minha nova conquista. Meu mais puro amor, saudades eternas...

Ao meu pai **Ailon Carlos** e minha segunda mãe **Antônia** que juntamente com minha mãe me deram todo seu amor e seus valores.

Ao meu amado esposo **Leandro Nacle** que sempre esta ao meu lado em todos os desafios, em todas as alegrias e dificuldades. Obrigada por toda paciência, compreensão, companheirismo, respeito, enfim; por todo seu amor. Essa vitória também é sua meu grande amor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. **Karina Matthes de Freitas Pontes**, exemplo de dedicação, determinação, competência, paciência, honestidade, ética e doçura. Assim a descrevo, minha querida orientadora e amiga. Muitas coisas boas aconteceram ao longo destes dois anos, fiquei noiva, casei e agora estou prestes a me tornar Mestre em Clínica Odontológica, sinto uma imensa alegria e honra em ter compartilhado todos estes momentos como sua orientanda e por fazer parte do Karina's team. Obrigada por tudo, pelos conselhos, pelo apoio, por acreditar e confiar no meu trabalho.

Aos professores **Cássio Pontes, Cláudio Maniglia, Élbio Holanda, Hilmo Falcão Filho, João Esmeraldo Mendonça e Solange Saito**, meus eternos mestres e amigos, grandes incentivadores da minha carreira docente, o meu muito obrigada.

À **Bruna Frota**, pela amizade, por toda disponibilidade e paciência ao me ensinar a bela arte da microbiologia, no início assustadora, mas hoje posso dizer encantadora.

À **Ramile Lima, Weslany Moraes, Jamila Alexandrino, Bruna Albuquerque, Pedro Acioly e David Queiroz** por me orientarem muitas vezes durante o período de realização dos experimentos microbiológicos, além das boas risadas nas manhãs, tardes, fins de semana e feriados de trabalho no laboratório.

Aos colegas **Ivo Albuquerque, Samara Marinho e Rodrigo Teles**, aos **Professores Rômulo Rocha e Wagner Negreiros** e todos os **alunos da graduação** que me ajudaram e disponibilizaram as Próteses Totais necessárias ao meu estudo.

À toda **equipe da disciplina de Prótese Fixa**, em especial **Dr. Marcus Aurélio Lima Verde**, por ter me recebido com tanto respeito e carinho desde o primeiro dia que comecei a frequentar a disciplina de prótese fixa clínica e pelo aprendizado não só científico como de vida durante o período de estágio a docência. Uma pessoa admirável que sempre estará vivo em meu coração.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em **Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues**, pela atenção ao programa. À **Lúcia e Janaine** pela presteza em ajudar na parte burocrática do mestrado.

Aos **professores do Programa de Pós-graduação** em Odontologia da UFC, pelos ensinamentos ministrados.

Aos **professores titulares e suplentes** da banca de defesa, por sua disponibilidade e apoio.

À instituição de fomento **CAPES** (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior), pela bolsa de estudo que me proporcionaram durante o programa de Mestrado.

RESUMO

A desinfecção ou esterilização de dispositivos de resina acrílica, como próteses imediatas, guias e goteiras cirúrgicas, é importante na prevenção da contaminação do paciente por micro-organismos potencialmente patogênicos. As resinas acrílicas são materiais termossensíveis, podendo somente ser descontaminadas por meios químicos ou frios. Esta dissertação teve como objetivos fazer uma revisão de literatura sistemática sobre a ação antimicrobiana de agentes químicos em resinas acrílicas, além de realizar um estudo experimental avaliando o efeito da terapia fotodinâmica, mediada pelo fotossensibilizador azul de metileno a 22 μM , sobre o nível de contaminação por micro-organismos presentes em próteses totais advindas de diferentes laboratórios protéticos, bem como um novo equipamento composto por diodos emissores de luz (LEDs) de 630 nm e 1W. Para a revisão de literatura foram utilizados os descritores "microorganisms", "dental prosthesis", e/ou "disinfection" nas bases de dados Pubmed/ Bireme, com busca no período de 2004 a 2014, incluindo artigos em inglês referentes a pesquisas experimentais, comparando-se agentes químicos sobre mais de uma espécie de micro-organismo, na superfície de resinas acrílicas. Foi verificado que os métodos apresentaram variações nos efeitos antimicrobianos, dependendo do tempo de imersão, concentração do produto e a espécie de micro-organismo presente. O hipoclorito de sódio 1%, o digluconato de clorexidina 2% e o ácido acético apresentaram maior eficácia, em ordem decrescente. No estudo experimental, foram selecionadas 25 próteses totais superiores precedendo a instalação nos pacientes. Em seguida, as mesmas foram aleatoriamente distribuídas por sorteio em quatro grupos: sem tratamento; imersão em digluconato de clorexidina 2% por 10 minutos; apenas irradiação com LEDs; terapia fotodinâmica (TFD). O circuito de controle e acionamento do equipamento composto por 8 LEDs de 1W foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Engenharia de Sistema de Computação, na Faculdade de Engenharia de Teleinformática da Universidade Federal do Ceará. No grupo TFD, a irradiação por 1 minuto ocorreu depois de 5 minutos da aplicação do fotossensibilizador. Após os tratamentos realizados, as próteses foram imersas em 100 ml de BHI caldo e levadas à cuba ultrasônica por 15 minutos. Foram coletados 5 ml deste meio de cultura para incubação por 48 horas a 37°C. Em seguida, 1000 microlitros do caldo foram diluídos em 1:10, 1:100, 1:1000 e plaqueados em triplicada, em Ágar Sangue, Ágar Sabouraud Dextrose, e Hicrome UTI Ágar®. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) e classificação dos dados em escala ordinal. Testes de Kruskal-Wallis, Dunn, ANOVA (2 critérios) e Bonferroni ($\alpha=0,05$) foram aplicados. A TFD mostrou redução significativa na contagem de bactérias totais viáveis ($p=0,0002$), quando comparada ao grupo somente irradiado, e redução significativa de fungos totais viáveis, quando comparada aos grupos sem tratamento e somente irradiado ($p=0,0002$). A TFD teve efeito antimicrobiano semelhante à imersão em digluconato de clorexidina 2% por 10 minutos ($p>0,05$). As espécies bacterianas identificadas mais prevalentes nas próteses foram *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* e a TFD promoveu diminuição significativa na contagem destas espécies, assim como a clorexidina ($p<0,001$). A contaminação de próteses dentárias advindas de laboratórios protéticos foi expressiva. A terapia fotodinâmica empregada no protocolo proposto para dispositivos de resina acrílica mostrou efeito antimicrobiano promissor mediante esta contaminação.

Descritores: Fotoquimioterapia. Resinas Acrílicas. Desinfecção. Prótese Dentária.

ABSTRACT

Disinfection or sterilization of acrylic resin devices, such as immediate prostheses, surgical guides and gutters, is important in preventing the patient from contamination by potentially pathogenic microorganisms. Acrylic resins are heat-sensitive materials, which can only be decontaminated by chemicals or cold means. This study aimed at making a systematic review of literature on the antimicrobial action of chemical agents on acrylic resins. In addition, it was carried out an experimental study evaluating the effect of photodynamic therapy, mediated by methylene blue photosensitizer to 22 μM , on the level of contamination by microorganisms present in dentures coming from different laboratories, and a new device consisting of light emitting diodes (LEDs) 630 nm and 1W. For the literature review, we used the descriptors microorganisms, dental prosthesis, and/or disinfection in Pubmed/ Bireme databases with search from 2004 to 2014, including articles in English on experimental studies comparing chemical agents on more than one species of microorganism in the surface of acrylic resin. It was found that methods show differences in antimicrobial effects depending on the immersion time, product concentration and type of present microorganism. Sodium hypochlorite 1%, chlorhexidine digluconate 2% and acetic acid showed greater efficacy, in decreasing order. In the experimental study, a number of 25 upper dentures were selected and installed in patients. Then, the dentures were randomly distributed into four groups: untreated; immersion in 2% chlorhexidine digluconate for 10 minutes; only irradiation with LEDs; photodynamic therapy (PDT). The control circuit and activation of equipment consisting of 8 LEDs 1W was developed in partnership with the Computer System Engineering Laboratory at the Faculty of Computer Engineering at the Federal University of Ceará. On the PDT group, irradiation for 1 minute took place 5 minutes after application of the photosensitizer. After the treatment, the prostheses were immersed in 100 ml of BHI broth and then brought to ultrasonic tank for 15 minutes. It was collected 5 ml of this culture for incubation for 48 hours at 37 ° C. After that, 1000 microliter of the broth were diluted 1:10, 1: 100, 1: 1000 and plated in triplicate, on Blood Agar, Sabouraud Dextrose Agar and HiCrome UTI Ágar®. The plates were incubated at 37°C for 48 h and then counting colony forming units (CFU / ml) and classification of data on an ordinal scale. Kruskal-Wallis test, Dunn, ANOVA (2 criteria) and Bonferroni ($\alpha = 0.05$) were applied. PDT showed significant reduction in count of total viable bacteria ($p = 0.0002$) compared to only irradiated group, and a significant reduction of total viable fungi, when compared to the only irradiated groups and untreated ($p = 0.0002$). PDT showed antimicrobial effect chlorhexidine digluconate for 10 minutes ($p > 0.05$). The most identified in the prostheses were *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli* and PDT caused a significant decrease in counting of these species as well as chlorhexidine did ($p < 0.001$). The contamination of dental prostheses coming from prosthetic laboratories was significant. Photodynamic therapy used in the proposed protocol for acrylic resin devices showed promising antimicrobial effect by this contamination.

Keywords: Photochemotherapy. Acrylic Resins. Disinfection. Dental Prosthesis.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TFD	Terapia Fotodinâmica
FS	Fotossensibilizador
LED	Diodo Emissor de Luz
n	Número
ml	Mililitros
°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
μl	Microlitros
min	Minuto
®	Marca Registrada
±	Mais ou Menos
p	Significância
>	Maior que
<	Menor que
LTDA	Limitada
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
W	Watts
UFC	Unidade Formadora de Colônia
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2	PROPOSIÇÃO.....	13
3	CAPÍTULOS.....	14
3.1	Capítulo 1.....	15
3.2	Capítulo 2.....	39
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	63
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	64
	APÊNDICE A.....	67
	APÊNDICE B.....	72
	ANEXO.....	77

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cavidade oral é colonizada por inúmeros agentes patogênicos que podem contribuir para o desenvolvimento de algumas doenças sistêmicas, como pneumonia por aspiração, doença pulmonar obstrutiva crônica e infecção gastrointestinal (WILLIAMS et al., 2011; SESMA et al., 2013). Alguns dispositivos acrílicos, como próteses totais imediatas, guias e goteiras cirúrgicas não estéreis, utilizados durante procedimentos que envolvem feridas cruentas (SMITH; PALENICK; BLANCHARD, 2011), podem agir como fonte potencial de infecções por micro-organismos patogênicos (WILLIAMS et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012; ABICHANDANI; NADIGER, 2013; FREITAS-PONTES et al., 2014). Além do processo de demuflagem (SALES; MORAES FILHO; ESTEVES, 2003), outra provável via de transmissão seriam os procedimentos de desgaste e polimento dos dispositivos (SALES; MORAES FILHO; ESTEVES, 2003; SILVA et al., 2010; ABICHANDANI; NADIGER, 2013), gerando infecção cruzada entre consultório odontológico e laboratório de prótese dentária.

Uma grande prevalência de espécies microbianas orais e não orais associadas à contaminação de próteses dentárias vindas do laboratório têm sido relatada (WILLIAMS et al., 2011; FROTA, 2012; RIBEIRO et al., 2012; FREITAS-PONTES et al., 2014; TEMÓTEO, 2014). *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* foram encontrados em dispositivos protéticos recém recebidos dos laboratórios (SMITH; PALENICK; BLANCHARD, 2011; WILLIAMS et al., 2011; FROTA, 2012; TEMÓTEO, 2014). Os agentes químicos digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio, ácido acético, glutaraldeído e pastilhas à base de perborato de sódio têm sido amplamente utilizados com sucesso para reduzir a contaminação microbiana de próteses dentárias, no entanto, algumas destas soluções podem alterar dureza, rugosidade, cor e estabilidade dimensional das resinas acrílicas (NIRALE; THOMBRE; KUBASAD, 2012; RIBEIRO et al., 2012) e alguns podem ser tóxicos ao organismo, devido a capacidade de sorção de líquidos do material (FROTA, 2012; CHASSOUT et al., 2006). Além dos agentes químicos, outra alternativa para desinfecção de dispositivos acrílicos é o uso da irradiação por micro-ondas (NIRALE; THOMBRE; KUBASAD, 2012), esterilização por óxido de etileno, plasma de peróxido de hidrogênio, raios gama e terapia fotodinâmica antimicrobiana (WILLIAMS et al.,

2011; FROTA, 2012; RIBEIRO et al., 2012; FREITAS-PONTES et al., 2014; TEMÓTEO, 2014).

Estudos relatam que a utilização de clorexidina 2% por 10 minutos como agente desinfetante, contribui para redução de alguns micro-organismos como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (SILVA et al., 2010; GANASHI et al., 2013; SALVIA et al., 2013), porém não é capaz de eliminar satisfatoriamente cepas de *Escherichia coli* (SILVA et al., 2010; SALVIA et al., 2013). A desinfecção com hipoclorito de sódio 1 a 2% por 10 minutos, embora eficiente na eliminação dos micro-organismos, pode causar um aumento na rugosidade superficial e uma diminuição na resistência flexural das resinas acrílicas, favorecendo a aderência de micro-organismos nas superfícies das próteses (NIRALE; THOMBRE; KUBASAD, 2012; FREITAS-PONTES et al., 2014). O ácido acético 50-100% possui boa eficácia contra *E. coli*, *S. mutans* e *Candida albicans* e demonstra ser uma opção promissora para o uso em clínica odontológica por ser atóxico e de baixo custo, porém efeitos sobre a superfície da resina acrílica devem ser estudados (SALVIA et al., 2013). O glutaraldeído apesar de ter sido indicado para desinfecção de materiais odontológicos tendo uma ação antibacteriana e esporicida comprovadas, teve a utilização proibida por seu potencial tóxico para uso em consultório odontológico (SALVIA et al., 2013; HIRT; SCHLIEVERT; DUNNY, 2002; ANVISA, 2014). As pastilhas à base de perborato de sódio podem reduzir *E. coli* e *S. mutans*, porém em porcentagens muito diferentes e insatisfatórias para outras espécies patogênicas (SILVA et al., 2008; SALVIA et al., 2013).

A irradiação por micro-ondas é um meio eficaz de desinfecção, no entanto, pode ocasionar alterações na estabilidade dimensional dos materiais envolvidos (NIRALE; THOMBRE; KUBASAD, 2012), e além disso, assim como as soluções de hipoclorito de sódio, não pode ser usada na desinfecção de próteses parciais removíveis devido a presença de metal em sua composição (RIBEIRO et al., 2012). Já a esterilização com óxido de etileno, plasma de peróxido de hidrogênio e raios gama embora eficientes, são métodos de uso hospitalar e de alto custo (CAMPANHA et al., 2005; SEO et al., 2007; FREITAS-PONTES et al., 2014).

É consenso que os materiais dentários não devem ter suas propriedades alteradas pelo processo de descontaminação (PAVARINA et al., 2006; PAVARINA et

al., 2007; TÁVORA, 2007; FROTA, 2012; NIRALE; THOMBRE; KUBASAD, 2012; RIBEIRO et al., 2012; FREITAS-PONTES et al., 2014), por esse motivo métodos alternativos e eficazes de desinfecção e esterilização de acrílico têm sido pesquisados (RIBEIRO et al., 2012; Frota, 2012; FREITAS-PONTES, et al., 2014). Estudos evidenciam que a terapia fotodinâmica (TFD) têm se mostrado uma modalidade terapêutica promissora na inativação de alguns tipos de micro-organismos patogênicos (DOVIGO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; FREITAS-PONTES et al., 2014), sendo também denominada terapia fotodinâmica antimicrobiana. O princípio básico da TFD, consiste na irradiação utilizando fontes de luz *laser* de baixa potência ou LED (diodo emissor de luz), de substratos corados por um fotossensibilizador (FS), gerando espécies reativas de oxigênio como, oxigênio singlete, íons superóxidos, hidroxilas e outros radicais livres, que têm a capacidade de matar ou danificar as células bacterianas, além de neutralizar seus fatores de virulência após a morte (FRANCO et al., 2010; DOVIGO et al., 2010; MIYABE et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012; FREITAS-PONTES et al., 2014). Embora o *laser* de baixa potência seja bastante utilizado, o LED apresenta algumas vantagens (RIBEIRO et al., 2012), como baixo custo, baixo componente térmico, luz monocromática e necessitam de menos energia para emissão do comprimento de onda desejado (ROSSONI et al., 2009; SIQUEIRA MARTINS et al., 2009; HATAKEYAMA et al., 2013). Além disso, os LEDs abrangem diferentes comprimentos de onda, cobrindo quase todos os espectros eletromagnéticos visíveis (RIBEIRO et al., 2012). Entre os fotossensibilizadores mais utilizados na TFD, o azul de metileno destaca-se por ter boa absorção em diferentes substratos, com afinidade a comprimentos de onda maiores que 620 nm, sendo biocompatível e apresentando um alto potencial antimicrobiano quando fotoativado (TEICHERT et al., 2002; KHANAL; BUI; SEO, 2014).

2 PROPOSIÇÃO

Essa dissertação de mestrado será apresentada em capítulos, tendo como objetivos:

Capítulo 1: Revisar a literatura concernente a ação antimicrobiana de diferentes agentes químicos como hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina, perborato de sódio, glutaraldeído e ácido acético sobre dispositivos acrílicos.

Capítulo 2: Realizar um estudo experimental avaliando a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por azul de metileno na mínima concentração inibitória e um novo dispositivo composto por diodos emissores de luz de 630 nm e 1W de potência, em próteses totais com contaminação advinda de laboratórios de prótese dentária.

3 CAPÍTULOS

REGIMENTO INTERNO

Esta dissertação baseia-se no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria e co-autoria do candidato. Assim sendo, essa dissertação é composta por dois capítulos, contendo dois artigos a serem submetidos para publicação em revistas científicas, conforme descrito abaixo:

Capítulo 1

“Agentes químicos com ação antimicrobiana aplicados à prótese dentária de resina acrílica – Revisão sistemática de literatura” Loiola DC, Prado JCH, Freitas-Pontes KMF. Este artigo será submetido à publicação no periódico **“Journal of Prosthodontic Research”**

Capítulo 2

“Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por azul de metileno e equipamento protótipo para irradiação de dispositivos protéticos em resina acrílica” Prado JCH, Frota de Carvalho BMD, Garcia BA, Freitas-Pontes KM. Este artigo será submetido à publicação no **“The Journal of Prosthetic Dentistry”**

3.1 Capítulo 1 – Artigo para publicação

“Agentes químicos com ação antimicrobiana aplicados à prótese dentária de resina acrílica – Revisão sistemática de literatura”

Loiola DC

Holanda-Prado JC

Freitas-Pontes KM

Este artigo será submetido à publicação no **“Journal of Prosthodontic Research”**

Agentes químicos com ação antimicrobiana aplicados à prótese dentária de resina acrílica – Revisão sistemática de literatura

Artigo de revisão

Palavras-chave: resinas acrílicas, desinfecção, prótese dentária.

Danielle Cordeiro Loiola^a

Janaína Câncio de Holanda Prado^a

Karina Matthes de Freitas Pontes^b

DDS, graduate student, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará. – a

PhD, adjunct professor, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará. – b

Corresponding author:

Karina Matthes de Freitas Pontes

Telefone: + 55 85 33668411

Rua Monsenhor Furtado S/N, Rodolfo Teófilo, CEP: 60430-350, Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail: kamatthes@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: Este estudo avaliou a eficácia de agentes químicos para desinfecção de próteses dentárias de resina acrílica, por meio de uma revisão sistemática da literatura. **Materiais e Métodos:** Foi utilizado os bancos de dados PubMed e Bireme no período de 2004 a 2014, com os descritores em inglês: “microorganisms”, “denture disinfection” “dental prosthesis”, “complete dentures” e/ou “disinfection”. As referências bibliográficas, assim como os artigos relacionados dos títulos selecionados, foram recuperados pela busca eletrônica e avaliados. Como critérios de inclusão foram: estudos experimentais que compararam dois ou mais agentes químicos desinfetantes, com grupo controle e análise microbiológica e os critérios de exclusão: estudos avaliando apenas uma espécie de micro-organismo e relatos de caso clínico. **Resultados:** A busca resultou primeiramente em 334 títulos de artigos, sendo selecionados 59 resumos e, destes, 14 para leitura de texto completo. Por fim, 4 artigos compuseram esta revisão, obedecendo todos os critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos. Estes estudos verificaram a eficácia antimicrobiana de soluções químicas, como hipoclorito de sódio 1% e 2%, glutaraldeído 2%, digluconato de clorexidina 2%, ácido acético 50% e 100%, solução de perborato de sódio a 3,8% e pastilhas a base de perborato de sódio, em análises microbiológicas. **Conclusões:** O hipoclorito de sódio a 1% apresentou-se com maior efeito antimicrobiano, chegando a reduzir, em média, 93,01% dos micro-organismos em diferentes períodos de imersão. O digluconato de clorexidina 2% apresentou uma média de 74,91% e o ácido acético 67,86% de redução microbiana, mostrando-se também como alternativas viáveis.

Palavras-chave: resinas acrílicas, desinfecção, prótese dentária.

Introdução

A cavidade oral é um ambiente colonizado por diversos micro-organismos, como bactérias, fungos e vírus [1, 2] e como as próteses são transportadas, ajustadas ou reparadas inúmeras vezes [3], a maioria destes micro-organismos podem ser transmitidos pelo sangue, saliva, gotículas ou aerossóis, principalmente nos procedimentos de acabamento e polimento das próteses [4, 5, 6], como também, por micro-organismos encontrados nas mãos dos profissionais envolvidos ou em bancadas de consultórios e laboratórios em geral. [7]

Estudos apontam que há uma deficiência de dentistas e técnicos de laboratório em evitar a infecção cruzada realizando as medidas de controle de forma inadequada ou negligenciado-as nos trabalhos protéticos. [5, 8] Uma grande prevalência de espécies microbianas orais e não orais associadas à contaminação nos equipamentos e próteses dentárias vindas do laboratório têm sido relatada. [6, 7, 9, 10] *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* foram encontrados em dispositivos protéticos recém recebidos do laboratório. [7, 11, 12] Estes micro-organismos em contato com a pele ou mucosa de pacientes saudáveis podem não gerar problemas, mas em pacientes idosos e/ou imunodeprimidos, principalmente com higiene oral precária, podem causar infecções importantes, como estomatite protética, pneumonia aspirativa e infecções gastrointestinais. [9, 10]

As resinas acrílicas são materiais termossensíveis e, embora existam outros métodos de desinfecção e/ou esterilização seguros [13] para próteses e dispositivos acrílicos, os agentes químicos são comumente utilizados, podendo ser eficazes na descontaminação, tanto no consultório odontológico, como no laboratório de prótese

dentária. [8] No entanto, devido à capacidade de sorção de líquidos da resina acrílica, há risco de resíduos destas substâncias serem liberados na cavidade oral quando as próteses estão em uso. Portanto, o produto ideal deve ser atóxico para garantir a segurança do operador e do paciente, ser eficaz contra os microorganismos, não causar danos às propriedades dos materiais envolvidos, além de ter baixo custo. [14, 15] Várias substâncias como: hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina, glutaraldeído e pastilhas à base de perbotato de sódio têm sido sugeridas para desinfecção da resina acrílica. [3, 15] Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo revisar sistematicamente a literatura acerca de estudos microbiológicos sobre métodos químicos atuais de desinfecção para próteses dentárias de resina acrílica e sua ação antimicrobiana.

Materiais e métodos

Estratégia de busca e seleção do estudo

Para orientação na busca de evidência nas bases de informação científica, a dúvida clínica foi estruturada segundo o acrônimo PICO (paciente/problema, intervenção, comparação, e desfecho/"outcome) [16, 17], utilizando-se P = amostras de resina acrílica, I = desinfecção química, C = controle e O = análise microbiológica (unidades formadoras de colônias). Buscas nos bancos de dados PubMed (Medline)/ Bireme, no período de 2004 a 2014, usando os descritores em inglês: "microorganisms", "denture disinfection", "dental prosthesis", "complete dentures" e/ou "disinfection", separadamente ou em combinação, foi realizada. As bibliografias dos artigos selecionados foram recuperadas pela busca eletrônica e avaliados. Artigos relacionados também foram coletados.

Os estudos foram selecionados por meio de critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: artigos publicados na língua inglesa, estudos experimentais que compararam, no mínimo, dois agentes químicos desinfetantes, com grupo controle e análise microbiológica. Os critérios de exclusão foram: estudos avaliando apenas uma espécie de micro-organismo, relatos de caso clínico, revisões de literatura. Este trabalho priorizou estudos *in vitro* devido à padronização metodológica, quando comparada à diversidade e heterogeneidade de metodologias utilizadas nos estudos clínicos encontrados.

Títulos e resumos foram selecionados para inclusão. Os textos completos dos artigos possivelmente relevantes foram analisados. Os artigos que atenderam aos critérios de inclusão foram submetidos à extração de dados, como tipo de corpo de prova, materiais desinfetantes analisados, espécies de micro-organismos inoculados, tempo e temperatura de imersão (protocolo para desinfecção) e tipo de resina acrílica utilizada.

Resultados

Trezentos e trinta e quatro artigos foram encontrados nas bases de dados. Quatorze artigos de texto completo foram selecionados e, finalmente, 4 incluídos, pois eram 6 estudos clínicos, 3 analisando apenas um tipo de micro-organismo e 1 utilizando coroas de Ni-Cr como corpo de prova (Figura 1 e Tabela 1).

Foram utilizadas resinas acrílicas polimerizadas termicamente e quimicamente nos experimentos. O tempo de imersão nas soluções desinfetantes variou entre 4 e 15 minutos. Em cada estudo foi realizada análise microbiológica para se estabelecer a quantidade de crescimento ou se havia crescimento microbiano positivo através da visualização da turvação do meio de cultura.

Os quatro estudos utilizados nesta revisão analisaram a eficácia do hipoclorito 1% e, apenas um, o hipoclorito 2% durante 5, 10 e 15 minutos de imersão. Três estudos analisaram o glutaraldeído 2% durante 5, 10, 15 minutos de imersão e o digluconato de clorexidina 2% durante 4, 8 e 10 minutos. Dois estudos analisaram pastilhas à base de perborato de sódio durante 10 minutos. A eficácia do perborato de sódio 3,8%, ácido acético 50% e 100% foram analisados em um único estudo. As análises de crescimento microbiano foram constituídas de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*. Os resultados dos estudos analisados estão apresentados nas Tabelas 2 a 8.

Discussão

O alto risco de infecção cruzada existente entre clínica odontológica e laboratório de prótese dental torna evidente a necessidade de desinfecção dos trabalhos protéticos antes de enviá-los e após recebê-los do laboratório. A esterilização por meios térmicos dos materiais acrílicos é inviável devido à baixa temperatura de ebulição do monômero. [15]

A seleção dos micro-organismos observados foi baseada na prevalência de doenças, como a estomatite protética, comumente relacionada à *C. albicans* [18, 19, 20], potencial patogênico de espécies como *E. coli*, que podem causar infecções disseminadas [20], *S. aureus* e *B. subtilis*, por sua resistência ao calor e a alguns grupos de desinfetantes [15], *P. aeruginosa* coexistente com *C. albicans*, que estão associadas a um risco elevado para pneumonia e doenças cardíacas em idosos [21, 22], *S. mutans* por sua frequência na microflora oral normal [15, 23] e *E. faecalis* por contribuir em casos de endocardite infecciosa. [24]

Os estudos utilizados nesta revisão, tiveram concordância em relação a maioria dos produtos testados quanto à eficácia antimicrobiana. No entanto, algumas divergências foram observadas. De acordo com da SILVA et al. (2008) [15] e SALVIA et al. (2013) [3], pastilhas à base de perborato de sódio reduziram *E. coli* e *S. mutans* em porcentagens muito diferentes. A solução de perborato de sódio a 3,8% não alcançou redução satisfatória para as espécies estudadas. O ácido acético demonstrou boa eficácia contra *E. coli*, *S. mutans* e *C. albicans*, demonstrando ser uma opção promissora para o uso em clínica odontológica por ser atóxico e de baixo custo. [3] Contudo, efeitos sobre a superfície da resina acrílica devem ser estudados.

Os estudos de da SILVA et al. (2008) [15], ORSI et al. (2011) [23] e SALVIA et al. (2013) [3], que analisaram o hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos, tiveram resultados semelhantes e boa eficácia, chegando a reduzir 100% de algumas espécies. A ação do hipoclorito de sódio a 1% foi menor contra *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Apenas ORSI et al. (2011) [23] avaliaram o hipoclorito de sódio a 2%. Este obteve redução de 100% de *C. albicans*, mesmo durante 5 minutos de imersão, no entanto, para *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, sua eficácia variou entre 20 e 80% de redução microbiana nos períodos estudados. É consenso que o hipoclorito de sódio apresenta boas propriedades bactericidas e bacteriostáticas [25], no entanto, sua elevada propriedade oxidativa e corrosiva pode alterar a estabilidade dimensional das resinas acrílicas [26]. GERNHARD et al. (2004) [27] em uma revisão sobre as principais complicações advindas do uso do hipoclorito de sódio, relataram que a toxicidade do hipoclorito pode causar reações teciduais inflamatórias graves.

O glutaraldeído a 2% foi analisado por da SILVA et al. (2008) [15], ORSI et al. (2011) [23] e GANESH et al. (2013) [28], onde esta substância apresentou ótima eficácia para os micro-organismos testados, exceto para *B. subtilis*, em que se alcançou apenas uma redução de 36,08% durante 10 minutos. O glutaraldeído a 2%, apesar de ter sido indicado para a desinfecção de materiais odontológicos, moldes e modelos, além de se mostrar eficaz por sua ação antibacteriana e esporicida em estudos anteriores [3, 28], teve sua utilização proibida por seu potencial de toxicidade, de acordo com a Resolução RDC 15 de 03/2012 para esterilização em consultório odontológico e a desinfecção em alto nível com esta substância segue normas específicas da ANVISA (2012). [29]

SALVIA et al. (2013) [3], verificaram que o digluconato de clorexidina 2% durante 10 minutos, mostrou boa atividade antimicrobiana em relação as espécies *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, porém não conseguiu reduzir satisfatoriamente cepas de *Escherichia coli*. Estes resultados estão de acordo com SILVA et al. (2008) [15], quando afirmam que atividade antimicrobiana deste agente desinfectante é maior para bactérias Gram-positivas. ESTRELA et al. (2003) [30] afirmam que a solução de digluconato de clorexidina 2% apresenta ação antimicrobiana semelhante ao hipoclorito de sódio 2% para algumas espécies bacterianas e não possui toxicidade aos tecidos.

Todos os artigos usados no presente estudo testaram a eficácia dos desinfetantes para cada espécie microbiana inoculada separadamente. No entanto, estudos analisando espécies simultaneamente ou biofilmes multi-espécies também podem trazer resultados relevantes. O método de contagem de UFC se mostrou mais preciso, por apresentar resultados quantitativos, que o método de visualização da turvação, o qual indica apenas a ausência de esterilização, ou seja, não é capaz

de indicar a quantidade de redução microbiana. Os dados apontaram que os métodos de desinfecção utilizados apresentaram ações na atividade antimicrobiana dependendo do tempo de imersão e concentração do produto utilizado e a eficácia dos desinfetantes variou dependendo da cepa examinada.

Considerações finais

Em relação à aplicabilidade dos resultados apresentados para a prática odontológica, o hipoclorito de sódio a 1% apresentou maior potencial antimicrobiano entre os desinfetantes avaliados. A clorexidina 2% e o ácido acético 50% e 100% se mostraram como alternativas viáveis, embora com menor ação antimicrobiana. A clorexidina 2% não foi capaz de eliminar satisfatoriamente cepas de *E. coli* e o ácido acético causou baixa redução de *B. subtilis* e *S. aureus*. Portanto, devido às limitações dos produtos usualmente indicados para desinfecção dos materiais protéticos, mais estudos são necessários para desenvolvimento de protocolos que visem a esterilização destes materiais.

Referências

1. Komulainen K, Ylostalo P, Syrjala AM, Ruoppi P, Knuuttila M, Sulkava R, et al. Oral health intervention among community-dwelling older people: a randomized 2-year intervention study. *Gerodontology* 2015; 32(1):62-72.
2. Yildirim-Bicer AZ, Peker I, Akca G, Celik. I. In vitro antifungal evaluation of seven different disinfectants on acrylic resins. *Biomed Res Int* 2014; 2014:1-9.
3. Salvia ACR, Matilde F dos S, Rosa, FC, Kimpara ET, Jorge AO, Balducci I, et al. Disinfection protocols to prevent cross-contamination between dental offices and prosthetic laboratories. *J Infect Public Health* 2013; 6:377-382.
4. Thomas MV, Jarboe G, Frazer RQ. Infection control in the dental office. *Dent Clin N Am* 2008; 52:609–628.
5. Yüzbaşıoğlu E, Saraç D, Canbaz S, Saraç SY, Cengiz S. A survey of cross-infection control procedures: knowledge and attitudes of Turkish dentists. *J Appl Oral Sci* 2009; 17:565-569.
6. Agostinho AM, Miyoshi PR, Gnoatto N, Paranhos HFO, Figueiredo LC, Salvador SI. Cross-contamination in the dental laboratory through the polishing procedure of complete dentures. *Braz Dent J* 2004; 15:138-143.
7. Sales DCT, Moraes Filho JP de, Esteves RA. Avaliação da contaminação cruzada durante o polimento das próteses nos laboratórios de prótese dentária em Belém-Pará. *Rev. bras. prótese clín. lab.* 2003; 5:417-424.
8. Silva MCVS, Cartaxo JUQ, Arioli Filho JN, Batista AUD. Evaluation of the biosecurity measures adopted in dental prosthesis laboratories of the city of João Pessoa, PB, Brazil. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2010; 10:101-106.

9. Nikawa H, Mamada T, Yamasiiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont* 1999; 12:153-159.
10. Williams DW, Chamary N, Lewis NMAO, Milward PJ, McAndrew R. Microbial contamination of removable prosthodontics appliances from laboratories and impact of clinical storage. *Br Dent J* 2011; 211:163-166.
11. Frota BMD. Terapia fotodinâmica antimicrobiana aplicada em espécimes de resina acrílica confeccionados em diferentes laboratórios de prótese dentária [dissertação]. Fortaleza; 2012.
12. Temóteo, GDA. Avaliação da contaminação cruzada entre diferentes laboratórios de prótese dentária e a clínica odontológica [dissertação]. Fortaleza; 2014.
13. Freitas-Pontes KM, Gomes CEA, Frota de Carvalho BMD, Sabóia RSC, Garcia BA. Photosensitization of in vitro biofilms formed on denture base resin. *J Prosthet Dent* 2014; 112:632-637.
14. Chassot ALC, Poisl MIP, Samuel SMW. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Braz Dent J* 2006; 17:117-121.
15. da Silva FC, Kimpara TE, Mancini MNG, Balducci I, Cardoso Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont* 2008; 17:627-633.
16. Bigby M. Understanding and evaluating systematic reviews and meta-analyses. *Indian J Dermatol* 2014; 59(2):134-139.

17. Schwindling FS, Rammelsberg P, Stober T. Effect of chemical disinfection on the surface roughness of hard denture base materials: a systematic literature review. Quintessence Publishing Co Inc. 2014; 27(3):215-225.
18. Batista JM, Birman EG, Cury AE. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de paciente com estomatite protética. Rev Odontol Univ São Paulo 1999; 13:343-348.
19. Penha SS, Birman EG, Silveira FRX da; Paula CR de. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. Pesq Odont Bras 2000; 14:119-122.
20. Vasconcelos LC de, Vasconcelos LCS, Ghersel ELA, Veloso DJ, Cunha Pasma. Denture hygiene: importance in denture stomatitis control. Rev Gaúcha Odontol. 2013; 61:255-261.
21. Adachi M, Ishihara K, Abe S, Okuda K. Professional oral health care by dental hygienists reduced respiratory infections in elderly persons requiring nursing care. Int J Dent Hygiene 2007; 5:69-74.
22. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. Incidence in Denture Wearers. Mycopathologia 2010; 169:365-372.
23. Orsi AI, Garcia Junior A, Villabona CA, Fernandes FHCN, Ito IY. Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerised acrylic resin. Gerodontology 2011; 28:253–257.

24. Hirt H, Schlievert MP, Dunny MG. In Vivo Induction of Virulence and Antibiotic Resistance Transfer in *Enterococcus faecalis* Mediated by the Sex Pheromone-Sensing System of pCF10. *Infect Immun* 2002; 70:716-723.
25. Nirale RM, Thombre R, Kubasad G. Comparative evaluation of sodium hypochlorite and microwave disinfection on dimensional stability of denture bases. *J Adv Prosthodont* 2012; 4:24-29.
26. Goel k, Gupta R, Solanki J, Nayak M. A comparative study between microwave irradiation and sodium hypochlorite chemical disinfection: a prosthodontics view. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014; 8(4): 42-46.
27. Gernhard CR, Eppendorf K, Brandt K&M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *International Endodontic Journal* 2004; 37:272-280.
28. Ganesh S, Gujjari AK, Shylesh Kumar BS, Ravi MB, Sowmya S, Meenakshi S. Comparative study to assess the effectiveness of various disinfectants on two microorganisms and the effect of same on flexural strength of acrylic denture base resin – an in vitro study. *J Int Oral Health* 2013; 5:55-62.
29. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) RDC 15 03/2012. www.anvisa.gov.br. Acessado em 10/11/201
30. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD (2003) Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian Dental Journal* 2003; 14:58-62.

LEGENDAS DAS FIGURA

Figura 1: Fluxograma de seleção dos estudos para essa revisão

Figura 1

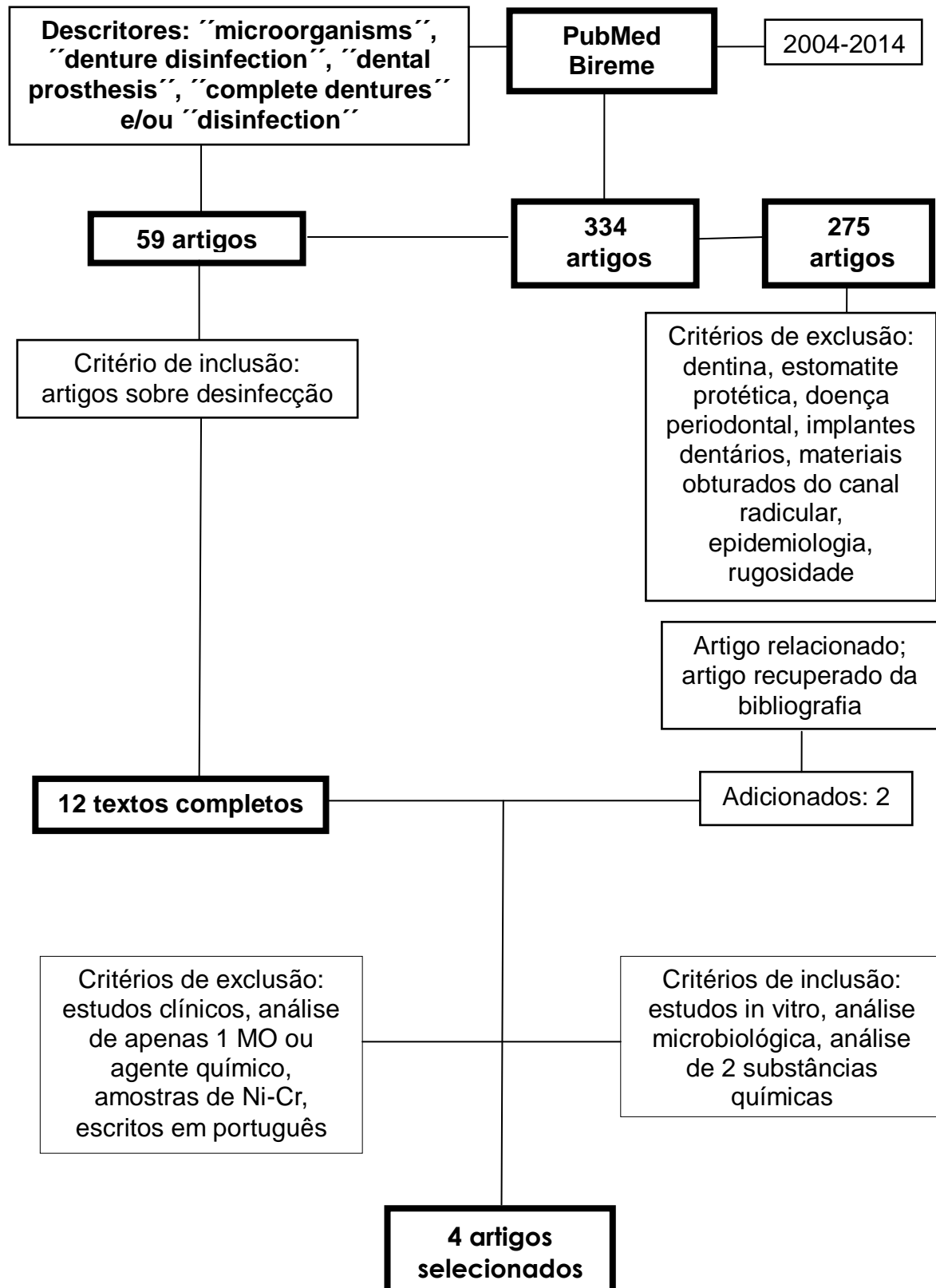


Tabela 1 : Artigos selecionados para a revisão sistemática

Estudo	Tipo de resina acrílica	N amostral	Micro-organismos	Materiais desinfetantes	Protocolo	Método microbiológico
da SILVA et al, 2008	Resina acrílica quimicamente ativada (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, Brasil, lote / lote 207040)	N=10	<i>C. albicans</i> (ATCC 18804), <i>S. mutans</i> (ATCC 35688), <i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>S. aureus</i> (ATCC 6538), e <i>B. subtilis</i> (ATCC 19659)	Hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina 2%, glutaraldeído 2%, vinagre 100%, pastilhas a base de perborato de sódio e perborato de sódio 3,8%.	Imersão na solução desinfetante por 10 min.	Contagem UFC
ORSI et al., 2010	Resina acrílica termopolimerizável (Lucitone 550 - Dentsply)	N=5	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. mutans</i> e <i>E. faecalis</i>	Hipoclorito de sódio a 1% e 2% e glutaraldeído 2%	Imersão na solução desinfetante por 5, 10 e 15 min.	Visualização da turvação meio
SALVIA et al., 2013	Resina acrílica termopolimerizável (Clássico; Clássico Artigos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil)	N=10	<i>C. albicans</i> , <i>S. mutans</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i>	Vinagre 50%, pastilhas a base de perborato de sódio, hipoclorito 1% e clorexidina 2%	Imersão na solução desinfetante por 10 min.	Contagem UFC
GANESH et al, 2013	Resina acrílica termopolimerizável (DPI Heat-Cure Improved ; DPI India, India)	N=10	<i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	Digluconato de clorexidina e glutaraldeído	Imersão na solução desinfetante por 4 e 8 min.	Visualização da turvação meio

Tabela 2: Porcentagem de redução no crescimento de *Candida albicans*.

	da Silva et al.	Salvia et al.	Orsi et al.			Ganesh et al.	
	10 min	10 min	5 min	10 min	15 min	4 min	8 min
Hipoclotiro 1%	84,91%	87,91%	100%	100%	100%	-	-
Hipoclorito 2%	-	-	100%	100%	100%	-	-
Glutaraldeído 2%	91,09%	-	100%	100%	100%	100%	100%
Clorexidina 2%	75,25%	100%	-	-	-	100%	100%
Ácido acético 100%	62,63%	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 50%	-	100%	-	-	-	-	-
Pastilhas à base de perborato de sódio	0%	0%	-	-	-	-	-
Perborato de sódio 3,8%	41,09%	-	-	-	-	-	-

Tabela 3: Porcentagem de redução no crescimento de *Staphylococcus aureus*.

	da Silva et al. 10 min	Salvia et al. 10 min	Orsi et al. 5 min	10 min	15 min	Ganesh et al. 4 min	8 min
Hipoclotiro 1%	89,69 %	96,7%	100%	100%	100%	-	-
Hipoclorito 2%	-	-	60%	80%	80%	-	-
Glutaraldeí o 2%	100%	-	100%	100%	100%	100%	100%
Clorexidina 2%	88,81 %	0%	-	-	-	100%	100%
Ácido acético 100%	48,7%	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 50%	-	0%	-	-	-	-	-
Pastilhas à base de perborato de sódio	22,97 %	42,99 %	-	-	-	-	-
Perborato de sódio 3,8%	18,3%	-	-	-	-	-	-

Tabela 4: Porcentagem de redução no crescimento de *Streptococcus mutans*.

	da Silva et al.	Salvia et al.	Orsi et al.			Ganesh et al.	
	10 min	10 min	5 min	10 min	15 min	4 min	8 min
Hipoclotiro 1%	100%	100%	80%	100%	100%	-	-
Hipoclorito 2%	-	-	80%	60%	40%	-	-
Glutaraldeí do 2%	95,76 %	-	80%	100%	80%	-	-
Clorexidina 2%	86,27 %	100%	-	-	-	-	-
Ácido acético 100%	85,26 %	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 50%	-	100%	-	-	-	-	-
Pastilhas à base de perborato de sódio	27,28 %	100%	-	-	-	-	-
Perborato de sódio 3,8%	46,47 %	-	-	-	-	-	-

Tabela 5: Porcentagem de redução no crescimento de *Escherichia coli*.

	da	Salvia	Orsi et al.			Ganesh et al.	
	Silva et al.	et al.	5 min	10 min	15 min	4 min	8 min
Hipoclorito 1%	100%	100%	-	-	-	-	-
Hipoclorito 2%	-	-	-	-	-	-	-
Glutaraldeído 2%	95,76%	-	-	-	-	-	-
Clorexidina 2%	14,15%	56,53%	-	-	-	-	-
Ácido acético 100%	74,15%	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 50%	-	100%	-	-	-	-	-
Pastilhas à base de perborato de sódio	0%	75,98%	-	-	-	-	-
Perborato de sódio 3,8%	46,47%	-	-	-	-	-	-

Tabela 6: Porcentagem de redução no crescimento de *Bacillus subtilis*.

	da	Salvia	Orsi et al.		Ganesh et al.		
	Silva et al.	et al.	5 min	10 min	15 min	4 min	8 min
Hipoclorito 1%	86,22 %	100%	-	-	-	-	-
Hipoclorito 2%	-	-	-	-	-	-	-
Glutaraldeído 2%	36,08 %	-	-	-	-	-	-
Clorexidina 2%	31,68 %	96,14 %	-	-	-	-	-
Ácido acético 100%	16,43 %	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 50%	-	39,32 %	-	-	-	-	-
Pastilhas à base de perborato de sódio	0%	0%	-	-	-	-	-
Perborato de sódio 3,8%	10,56 %	-	-	-	-	-	-

Tabela 7: Porcentagem de redução no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

	da Silva et al.	Salvia et al.	5 min	Orsi et al. 10 min	15 min	Ganesh et al. 4 min	8 min
Hipoclotiro 1%	-	-	80%	80%	100%	-	-
Hipoclorito 2%	-	-	60%	80%	80%	-	-
Glutaraldeído 2%	-	-	80%	100%	100%	-	-
Clorexidina 2%	-	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 100%	-	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 50%	-	-	-	-	-	-	-
Pastilhas à base de perborato de sódio	-	-	-	-	-	-	-
Perborato de sódio 3,8%	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 8: Porcentagem de redução no crescimento de *Enterococcus faecalis*.

	da Silva et al.	Salvia et al.	Orsi et al.			Ganesh et al.	
			5 min	10 min	15 min	4 min	8 min
Hipoclotiro 1%	-	-	80%	80%	80%	-	-
Hipoclorito 2%	-	-	20%	60%	40%	-	-
Glutaraldeído 2%	-	-	100%	60%	100%	-	-
Clorexidina 2%	-	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 100%	-	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 50%	-	-	-	-	-	-	-
Pastilhas à base de perborato de sódio	-	-	-	-	-	-	-
Perborato de sódio 3,8%	-	-	-	-	-	-	-

3.2 Capítulo 2 – Artigo para publicação

“Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por azul de metileno e equipamento protótipo para irradiação de dispositivos protéticos em resina acrílica

Holanda-Prado JC

Frota de Carvalho BMD

Garcia BA

Freitas-Pontes KM

Este artigo será submetido à publicação no **“The Journal of Prosthetic Dentistry”**

“Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por azul de metileno e equipamento protótipo para irradiação de dispositivos protéticos em resina acrílica

Janaína Cância de Holanda Prado^a, Bruna Marjorie Dias Frota^a, Bruna Albuquerque Garcia^a,
Karina Matthes de Freitas-Pontes^b

^a DDs graduated student, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará

^bPhd, associate professor, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará

Corresponding author:

Karina Matthes de Freitas Pontes

Rua Monsenhor Furtado S/N, Rodolfo Teófilo, CEP:60.430-350, Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail: kamatthes@yahoo.com.br

RESUMO

Declaração do problema: A descontaminação de dispositivos protéticos deve prevenir a infecção cruzada entre laboratório e clínica. **Objetivo:** Este trabalho avaliou o efeito antimicrobiano e a viabilidade técnica da terapia fotodinâmica (TFD) mediada pelo fotossensibilizador azul de metileno a 22 μM e irradiação por um equipamento protótipo com oito diodos emissores de luz (LEDs) de 630 nm e 1 W, mediante contaminação presente em próteses acrílicas antes da instalação. **Materiais e Métodos:** Vinte e cinco próteses totais superiores foram distribuídas aleatoriamente em grupos: sem tratamento; imersão em digluconato de clorexidina 2%, 10 minutos; irradiação por LEDs, 1 minuto; TFD (irradiação 1 minuto, após 5 minutos da aplicação do fotossensibilizador estéril nas superfícies das próteses). Em seguida, as próteses foram imersas em BHI caldo e sonicadas 15 minutos. O caldo foi incubado por 48 horas a 37°C, diluído e plaqueado em triplicata sobre Ágar Sangue, Ágar Sabouraud Dextrose e Hicrome UTI Agar®. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, para posterior contagem de unidades formadoras de colônias e classificação dos dados em escala ordinal. Testes de Kruskal-Wallis/Dunn, ANOVA 2-critérios/Bonferroni ($\alpha=0,05$) foram aplicados. **Resultados:** A TFD reduziu bactérias viáveis ($p=0,0002$) comparada ao grupo irradiado e reduziu fungos viáveis, comparada aos sem tratamento e irradiado ($p=0,0002$). As bactérias mais prevalentes identificadas foram *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* e a TFD diminuiu significativamente suas contagens ($p<0,001$), com efeito semelhante à clorexidina ($p>0,05$). **Conclusões:** A TFD no protocolo proposto para dispositivos de resina acrílica, mostrou efeito antimicrobiano promissor e viabilidade técnica.

Implicações clínicas: Os resultados deste estudo demonstraram que próteses dentárias podem trazer contaminação importante dos laboratórios protéticos, sendo necessários cuidados para prevenção de infecção cruzada. Também foi observada a viabilidade do uso da terapia fotodinâmica na rotina clínica para descontaminação rápida de dispositivos acrílicos, antes da inserção na cavidade oral dos pacientes ou devolução ao laboratório.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, desinfecção, resinas acrílicas.

INTRODUÇÃO

Alguns dispositivos acrílicos como: próteses totais imediatas, guias e goteiras cirúrgicas, utilizados após exodontias múltiplas ou procedimentos cirúrgicos para instalação de implantes dentários,¹ podem agir como fonte potencial de infecção por micro-organismos patogênicos,²⁻⁶ capazes de causar problemas sistêmicos relacionados ao sistema pulmonar^{7,8} e trato urinário,⁹ bem como infecções gastrointestinais,¹⁰ doenças cardíacas em pacientes idosos^{7,8} e endocardite infecciosa.¹¹ Uma grande prevalência de espécies microbianas orais e não orais associadas à contaminação de próteses dentárias vindas do laboratório têm sido relatada.^{2, 3, 5, 12, 13, 14} *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* foram encontrados em dispositivos protéticos recém recebidos dos laboratórios.^{3, 12, 13} Estes dispositivos acrílicos são classificados como materiais termosensíveis,^{15, 16} portanto, torna-se necessário estabelecer um protocolo de descontaminação simples e eficaz, capaz de eliminar todos os micro-organismos que possam estar aderidos à superfície do material sem prejuízos às propriedades físicas e mecânicas do mesmo.^{3,5}

A terapia fotodinâmica (TFD) vem sendo aplicada com sucesso em diversas especialidades odontológicas: cariologia, endodontia, implantodontia e periodontia,¹⁷ e atualmente vêm sendo pesquisada na área de reabilitação oral como uma alternativa eficaz na desinfecção e esterilização de resinas acrílicas.⁵ O princípio básico da TFD antimicrobiana, consiste na irradiação de uma substância conhecida como fotossensibilizador (FS) aplicada em um substrato contaminado por bactérias e/ou fungos, por uma fonte de luz, que pode ser um *laser* de baixa potência ou um diodo emissor de luz (LED). Quando as células microbianas coradas pelo FS absorvem essa fonte de luz, espécies reativas de oxigênio são formadas através de dois tipos de reações químicas. A reação do tipo I ocorre através da transferência de elétrons, produzindo íons superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais

hidroxila, e a reação do tipo II acontece pela transferência de energia, causando a formação de oxigênio singlete,¹⁸ que possuem a capacidade de matar ou danificar as células bacterianas.^{3, 5, 18, 19, 20} A eficácia da TFD depende de alguns fatores como, comprimento de onda (λ) da luz utilizada e sua interação com o fotossensibilizador, potência, tempo de irradiação, modo de funcionamento e convergência do feixe de luz.¹⁸ Embora a luz *laser* de baixa potência seja mais utilizada em TFD, a luz de LED apresenta algumas vantagens,³ como baixo custo, baixo componente térmico, luz monocromática, necessidade de menos energia para emissão do comprimento de onda desejado, podendo gerar efeitos semelhantes à terapia com *laser* de baixa.^{3, 21, 22, 23} Além disso, existem diferentes cores da luz LED, que têm radiações cobrindo quase todos os espectros eletromagnéticos visíveis.³ A fonte de luz LED vermelho (λ 630 a 700 nm) associada a fotossensibilizadores sensíveis a este comprimento de onda tais como, azul de metileno (MB), azul de orto toluidina (TBO) e verde malaquita (MG), tem sido amplamente utilizada em TFD, resultando em morte significativa de micro-organismos patogênicos.¹⁸ Dentre estes, o azul de metileno além de absorver comprimentos de onda maiores que 620nm de maneira eficaz, possui baixa toxicidade aos tecidos e um alto potencial antimicrobiano quando fotoativado.^{24, 25}

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano e a viabilidade técnica da TFD mediada pelo fotossensibilizador azul de metileno a 22 μ M e irradiação por um equipamento protótipo composto por oito diodos emissores de luz (LEDs) de 630 nm e 1 W, mediante contaminação presente em próteses acrílicas antes da instalação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

O estudo foi do tipo experimental, randomizado, transversal e controlado, em que próteses totais recém acrilizadas e recém recebidas de alguns laboratórios protéticos da cidade de Fortaleza-CE, Brasil, foram selecionadas. Os critérios de inclusão para a seleção das

próteses foram: prótese total superior, confeccionada com resina acrílica termopolimerizável, com dentes de acrílico de dupla prensagem, polida mecanicamente com pedra pomes e branco de espanho, feita para paciente com rebordo alveolar regular. Os critérios de exclusão foram: presença de defeitos no acrílico, como trincas, porosidades, bolhas e polimento inadequado. Optou-se por amostras de próteses totais, por serem dispositivos apenas acrílicos, que apresentam áreas propícias ao acúmulo de detritos e contaminações, como a superfície interna não polida, as ameias e espaços interdentais, sendo um bom representativo.

Uma análise de poder estatístico foi realizada com o software BioEstat 5.3 (Instituto Marimauá, Manaus, AM, Brasil) para confirmação do tamanho amostral, a partir de dados preliminares obtidos com o presente estudo.

Desenho experimental

As próteses totais foram distribuídas aleatoriamente, por sorteio utilizando-se o programa Microsoft Excel 2010, em quatro grupos: sem tratamento; imersão em digluconato de clorexidina 2% por 10 minutos; irradiação com LED (λ 630 nm / 1 W) por 1 minuto; TFD mediada por azul de metileno 22 μ M por 5 minutos e LED (λ 630 nm / 1W) por 1 minuto. Todos os tratamentos e suas etapas foram realizados dentro de câmara de fluxo laminar.

As próteses totais foram removidas das embalagens enviadas pelos laboratórios, sem lavagem prévia em água corrente, dentro do fluxo laminar: sem tratamento, foram submetidas aos procedimentos microbiológicos; imersão em clorexidina, foram imersas em 100 ml de solução de digluconato de clorexidina 2% manipulado (Ethicall farmácia com manipulação LTDA) por 10 minutos.

Fotossensibilizador e Fonte de luz

O fotossensibilizador selecionado foi o azul de metileno (Vetec Fine Chemicals LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil) na mínima concentração inibitória de 22 μ M.^{5, 13} A

solução foi esterilizada por meio de filtração à vácuo (Sistema de filtração à vácuo 500 ml, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil).

A fonte de luz selecionada para o estudo foi um equipamento protótipo composto por LEDs com comprimento de onda de 630 nm, planejado para irradiação de todas as superfícies de um dispositivo protético, simultaneamente. O circuito de controle e acionamento do aparelho foi desenvolvido em parceria com o LESC (Laboratório de Engenharia de Sistema de Computação), na Faculdade de Engenharia de Teleinformática da Universidade Federal do Ceará. A área iluminada foi internamente a um cubo de 8 cm de lado, com 8 LEDs distribuídos em suas faces, através de um modelo de potência luminosa e dissipação de calor. Foram utilizados LEDs da série S com 1W de potência e sem dissipador próprio (Cromatek, Guarulhos, SP, Brasil). Externo ao cubo há uma placa de controle alimentada por uma fonte chaveada, devido à necessidade de uma maior eficiência na potência dissipada. Essa placa de controle é composta de um microcontrolador ARM (Advanced RISC Machine), que comanda o drive de potência para acionamento dos LEDs através de um PWM (Pulse-Width Modulation- modulação por largura de pulso), regulado pelo usuário (Figuras 1, 2 e 3).

Protocolo para irradiação

As próteses somente irradiadas, após serem removidas das embalagens enviadas pelos laboratórios foram colocadas diretamente no equipamento protótipo de LEDs e submetidas à irradiação por 1 minuto, que abrangeu toda área da base da prótese: interna, externa e lateralmente. Ao final do período de irradiação, as próteses foram removidas, assepticamente, do equipamento.

Protocolo para TFD

As próteses foram coradas, em toda sua extensão interna e externa, com 20 ml de azul de metileno $22\mu\text{M}$, por meio de lavagem com uso de seringa de 10 ml, e foram aguardados 5 minutos. Em seguida, foram colocadas individualmente dentro do equipamento protótipo de

LEDs e submetidas à irradiação por 1 minuto semelhante ao que foi descrito no protocolo para irradiação.

Procedimentos microbiológicos

Após os tratamentos, as próteses totais foram imersas individualmente em *becker* contendo 100 ml de Brain Heart Infusion caldo (BHI, Himedia, New York, USA), e colocadas em cuba ultrasônica (UltraCleaner 1400, Unique LTDA, São Paulo, Brasil) por 15 minutos. Foram coletados 5 ml deste meio de cultura em tubo tipo *falcon*, que foi colocado em estufa de CO₂ por 48 horas a 37°C. Após este período, foi checado se houve ou não turvação do meio e 1ml foi coletado para tubo tipo *ependorf*, e realizada diluição seriada 1:10, 1:100, 1:1000, em outros tubos contendo solução de cloreto de sódio 0,89%. Em seguida, foi realizado o plaqueamento de 25µl em Ágar Sangue (Himedia, New York, USA), Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi LTDA, Paraná, Brasil), e HiCrome UTI Ágar® (Himedia, New York, USA). As placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C, para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O Ágar sangue evidenciou a quantidade de bactérias viáveis, o Ágar Sabouraud Dextrose mostrou a quantidade de fungos viáveis, enquanto o HiCrome UTI Ágar®, meio de cultura cromogênico, possibilitou a identificação de algumas espécies bacterianas potencialmente patogênicas presentes.

Análise de resultados

Os dados da contagem de UFC nas placas foram convertidos em UFC/ml e organizados em uma escala ordinal, conforme o quadro 1. Desta forma, os resultados da contagem de bactérias e fungos totais viáveis foram analisados estatisticamente por meio dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn, comparando-se todos os grupos entre si ($\alpha=0,05$). Testes de Análise de Variância (ANOVA-dois critérios) e Bonferroni, foram empregados para comparação dos tratamentos para as diferentes espécies de bactérias viáveis identificadas nas placas de meio de cultura cromogênico ($\alpha=0,05$).

Quadro 1. Escala ordinal referente à contagem de UFC/ml de microorganismos.

UFC/ml	Escore
0	1
1 – 9,9999999 x 10	2
10 ² - 9,9999999 x 10 ³	3
10 ⁴ – 9,9999999 x 10 ⁵	4
10 ⁶ - 9,9999999 x 10 ⁷	5
≥10 ⁸	6

RESULTADOS

Seguindo os critérios de inclusão e exclusão, 34 próteses totais foram previamente selecionadas, mas 25 permaneceram no estudo: 7 sem tratamento, 5 imersas em digluconato de clorexidina 2%, 5 apenas irradiadas com LEDs e 8 tratadas com terapia fotodinâmica. Nove próteses foram desconsideradas devido à contaminação durante o experimento.

Para a contagem de bactérias totais viáveis semeadas em placas com Ágar sangue, foram observados escores médios de 6, ou seja, crescimento maior ou igual a 10⁸ para os grupos sem tratamento e somente irradiado ($p > 0,05$). As próteses tratadas com digluconato de clorexidina 2% e TFD apresentaram efeito semelhante ($p > 0,05$). A clorexidina eliminou quase totalmente a contaminação presente e, comparando-se ao grupo sem tratamento, a TFD mostrou uma redução de três escores, correspondendo a cerca de cinco \log_{10} ($p = 0,0002$) (Figura 4).

Entre as bactérias identificadas, a *P. aeruginosa* foi uma das mais prevalentes, atingindo escore próximo a 5 nos grupos sem tratamento e somente irradiados ($p > 0,05$). Nos grupos clorexidina e TFD, houve uma diminuição para próximo do escore 1, com \log_{10} redução em torno de quatro, comparando-se aos grupos sem tratamento e somente irradiado

($p < 0,001$). A bactéria *K. pneumoniae* foi também uma das mais prevalentes atingindo o escore 5 no grupo sem tratamento e escore 4 no grupo somente irradiado ($p > 0,05$). Nos grupos tratados com clorexidina e TFD, esse micro-organismo não foi identificado ($p < 0,001$). A terceira espécie bacteriana mais encontrada foi *E. coli*, atingindo escore próximo a 3 para o grupo sem tratamento e maior do que 4 para o grupo somente irradiado ($p > 0,05$). Nos grupos tratados com clorexidina e TFD não houve crescimento ($p < 0,001$). *S. saprophyticus*, *E. faecalis* e *S. aureus* também foram identificados, porém em menor número e sem diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 5).

Em relação a contagem de fungos totais viáveis, observou-se escore 5 para os grupos sem tratamento e somente irradiado ($p > 0,05$). Nos grupos tratados com clorexidina e TFD, houve eliminação total ($p = 0,0002$) (Figura 6).

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo rejeitaram parcialmente a hipótese nula, pois houve diferença entre próteses que não receberam tratamento comparadas às próteses tratadas com clorexidina e terapia fotodinâmica; e a aplicação da terapia fotodinâmica mostrou resultados semelhantes a imersão em clorexidina.

Williams et al. (2011) ² num estudo feito sobre contaminação de dispositivos protéticos, demonstrou que 57,5% de 40 próteses acrílicas recém recebidas de laboratórios dentários estavam contaminadas. *Bacillus spp*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e fungos do gênero *Cândida* foram os micro-organismos mais prevalentes neste estudo. Temóteo (2014) ¹³, num estudo *in vitro*, avaliou o grau de contaminação observada em espécimes de resina acrílica confeccionados por quatorze laboratórios protéticos na cidade de Fortaleza, CE, Brasil e foram verificadas contaminações em todos os laboratórios. Foram identificadas neste

estudo, *Pseudomonas spp*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Escherichia coli*, sendo a primeira espécie a mais prevalente.

O presente estudo experimental demonstrou que todas as próteses avaliadas no grupo sem tratamento estavam contaminadas com bactérias e fungos viáveis. Bactérias como *Pseudomonas aeruginosas*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* foram encontradas, sendo a primeira e a segunda em maior quantidade. *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* são bactérias *Gram-negativo*, portanto mais resistentes, virulentas e com maior potencial patogênico.⁶ *P. aeruginosa* está associada a um risco elevado para pneumonia, doenças cardíacas em idosos e é um dos principais agentes de infecção hospitalar;^{7, 8} *K. pneumoniae* é comumente encontrada no trato intestinal, sendo um patógeno oportunista, que pode levar a bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário e outros tipos de infecções humanas;⁹ *E. coli*, pode causar infecções disseminadas.¹⁰ *E. faecalis* e *S. aureus* são bactérias classificadas como *Gram-positivo*: *E. faecalis* pode contribuir em casos de endocardite infecciosa¹¹ e *S. aureus* são resistentes ao calor e a alguns grupos de desinfetantes¹⁵, podendo causar diversos tipos de infecções e intoxicações. Acredita-se que, pela topografia das próteses totais e as propriedades de superfície das resinas acrílicas, a aderência e retenção destes micro-organismos patogênicos seja facilitada.

O agente químico digluconato de clorexidina 2% foi utilizado no estudo, por sua eficácia antimicrobiana reconhecida.^{1, 15} Estudos relatam que a utilização do digluconato de clorexidina 2% por 10 minutos, contribui para redução de alguns micro-organismos, como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*,^{14, 16, 26} porém não é capaz de eliminar satisfatoriamente cepas de *Escherichia coli*^{14, 26} Além disso, contribui para redução da formação do biofilme em próteses dentárias e melhora a condição da mucosa do paciente, combatendo a estomatite protética.^{15, 16} Porém, seu uso frequente pode causar

manchamento da resina acrílica.^{15, 16} Neste estudo a imersão em clorexidina comprovou sua eficácia antimicrobiana, diante da carga de micro-organismos presentes nas próteses em questão.

Observou-se que no grupo TFD, também houve eliminação quase que totalmente dos micro-organismos presentes nas próteses totais envolvidas no estudo, tendo efeito semelhante ao grupo imerso em clorexidina. Esse resultado corrobora com estudo prévio, que utilizou a associação de azul de metileno e LED vermelho sobre biofilmes formados em resina acrílica por cepas representativas de Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras, observando efeito antimicrobiano diretamente proporcional à densidade de energia empregada,⁵ o que influenciou o delineamento deste estudo e a busca por um equipamento de luz mais potente.

A potência de cada LED que compõe o equipamento protótipo é de 1 W, e sua distribuição no interior do cubo permite que todas as regiões da prótese sejam irradiadas simultaneamente. No entanto, não foi possível calcular a densidade de energia (J/cm^2) total entregue em cada região, pela dificuldade em determinar a área exata que cada LED irradiou, nas diferentes próteses. Diferentes tamanhos, formatos e topografias das próteses não permitem que a distância entre a saída da luz e o objeto sejam iguais em todas as regiões. Outro motivo é a sobreposição das áreas irradiadas pelos diferentes LEDs do aparelho. Por isso, houve dificuldade em se fazer comparações com resultados de outros estudos, que reportam o protocolo de TFD pela densidade de energia. Neste trabalho, a potência de saída de 1 W de cada LED possibilitou a previsão de um menor tempo de irradiação em relação a outras pesquisas que utilizaram TFD³, uma vez que a densidade de energia é igual a potência da luz (W) multiplicada pelo tempo (s) e dividido pela área irradiada (cm^2).²⁷ Um menor tempo de irradiação é desejável para tornar o protocolo mais rápido, prático e viável clinicamente. O grupo somente irradiado foi criado para confirmar que a associação da luz com o fotossensibilizador é fundamental para o efeito antimicrobiano, confirmando também

que o equipamento não está causando aquecimento ou morte de micro-organismos por desidratação.

O fotossensibilizador utilizado foi manipulado na concentração mínima inibitória de 22 μM , que é suficientemente baixa, mostrando-se com efeito antimicrobiano apenas quando em contato com a luz de comprimento de onda compatível e sendo, ao mesmo tempo, incapaz de pigmentar a resina acrílica (Figura 7). Esta foi a idéia deste estudo, utilizar um novo equipamento de irradiação com LEDs mais potentes, possibilitando a redução da concentração inibitória do azul de metileno. Não existe no mercado odontológico atual nenhum aparelho de LED vermelho e de maior potência, para emprego na terapia fotodinâmica com corantes azuis, assim como também não existe uma câmara irradiadora que permita uma irradiação tridimensional simultânea de um objeto.

Algumas limitações foram observadas durante a realização deste estudo, como o *design* do novo aparelho. Embora tenha se conseguido abranger todas as áreas da prótese total, estas não receberam de forma homogênea a incidência da luz, por isso, novos estudos devem ser realizados visando aperfeiçoar esse dispositivo de luz a fim de torná-lo um aparelho prático e preciso para ser usado pelos cirurgiões dentistas. Sugere-se também mais estudos testando novos tempos de irradiação, novas fontes de luz com comprimentos de onda diferentes utilizando outras classes de fotossensibilizadores.

A contaminação cruzada existente entre consultório odontológico e laboratório de próteses dental é uma problemática preocupante e precisa ser compreendida e abordada com prudência pela classe odontológica e demais profissionais auxiliares envolvidos: auxiliares de saúde bucal e técnicos em prótese dentária. Por isso, a desinfecção ou esterilização destes dispositivos antes de serem instalados é uma etapa de extrema importância na prevenção da contaminação e não deve ser negligenciada. É consenso que a utilização de clorexidina 2% por 10 min, como meio desinfectante é eficaz sobre a maioria das espécies de micro-organismos encontrados em próteses recém acrilizadas, no entanto, a terapia fotodinâmica mostrou um efeito promissor,

diante das limitações na técnica, que poderão conduzir ao aumento do potencial antimicrobiano para espécies mais resistentes, possibilitando a esterilização de dispositivos acrílicos.

CONCLUSÃO

As próteses totais recém acrilizadas e recém recebidas dos laboratórios de prótese dentária apresentaram uma contaminação relevante e heterogênea de micro-organismos. O estudo mostrou que a terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando o fotossensibilizador azul de metileno 22 μM associado ao equipamento protótipo de LEDs reduziu significativamente a contagem de micro-organismos encontrados nas próteses totais, exercendo efeito semelhante à imersão em digluconato de clorexidina 2% por 10 minutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith PN, Palenik CJ, Blanchard SB. Microbial Contamination and the Sterilization/Disinfection of Surgical Guides Used in the Placement of Endosteal Implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2011; 26:274-281
2. Williams DW, Chamary N, Lews MAO, Milward PJ, McAndrew R. Microbial contamination of removable prosthodontics appliances from laboratories and impact of clinical storage. *British Dental Journal* 2011; 211:163-166.
3. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Oliveira Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, Vergani CE. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. *Lasers Med Sci* 2012; 27:161-168.
4. Abichandanic SJ, Nadiger R. Cross-contamination in dentistry: A comprehensive overview. *Chron Young Sci* 2013; 4:51-58.
5. Freitas-Pontes KM, Gomes CEA, Frota de Carvalho BMD, Sabóia RSC, Garcia BA. Photosensitization of in vitro biofilms formed on denture base resin. *J Prosthet Dent* 2014; 112:632-637.
6. Godlewska R, Wisniewska K, Pietras Z, Jagusztyn-Krynicka EK. Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 298:1-11.
7. Adachi M, Ishihara K, Abe S, Okuda K. Professional oral health care by dental hygienists reduced respiratory infections in elderly persons requiring nursing care. *Int J Dent Hygiene* 2007; 5:69-74.
8. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. Incidence in Denture Wearers. *Mycopathology* 2010; 169:365-372.
9. Nordman P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The lancet infection diseases*, 2009; 9:228-236.
10. Batista JM, Birman EG, Cury AE. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de paciente com estomatite protética. *Ver Odontol Univ São Paulo* 1999; 13:343-348.
11. Hirt H, Schlievert MP, Dunny MG. In Vivo Induction of Virulence and Antibiotic Resistance Transfer in *Enterococcus faecalis* Mediated by the Sex Pheromone-Sensing System of pCF10. *Infect Immun* 2002; 70:716-723.
12. Sales DCT, Moraes Filho JP de, Esteves RA. Avaliação da contaminação cruzada durante o polimento das próteses nos laboratórios de prótese dentária em Belém-Pará. *Revista Brasileira de Prótese Clínica & Laboratorial* 2003; 5:417-424.
13. Temóteo, GDA. Avaliação da contaminação cruzada entre diferentes laboratórios de prótese dentária e a clínica odontológica [dissertação]. Fortaleza; 2014.

14. Silva MCVS, Cartaxo JUQ, Arioli Filho JN, Batista AUD. Evaluation of the biosecurity measures adopted in dental prosthesis laboratories of the city of João Pessoa, PB, Brazil. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2010; 10:101-106.
15. da Silva FC, Kimpara TE, Mancini MNG, Balducci I, Cardoso Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont* 2008; 17:627-633.
16. Ganashi S, Gujjari AK, Kumar SBS, Ravi MB, Sowmia S, Meenakshi S. Comparative Study to Assess the Effectiveness of Various Disinfectants on two Microorganisms and the effect of same on Flexural Strength of Acrylic Denture Base Resin - An In Vitro Study. *Journal of International Oral Health* 2013; 5:55-62.
17. Myabe M, Junqueira JC, Costa ACBO, Jorge AOC, Ribeiro MS, Feist IS. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of staphylococcus spp. *Braz Oral Res* 2011; 3:230-234.
18. Rolim JPML, de-Melo MAS, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NAP, Zanin ICJ, Rodrigues LKA. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol.* 2012; 106:40-46.
19. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Adriano CS, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of four candida species induced by photogem[®]. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41: 42-49.
20. Franco JEM, Cai S, Lima LAPA, Gonçalves AS, Campos TN. Avaliação da capacidade de descontaminação da terapia fotodinâmica no pós-operatório imediato de implantes : estudo piloto. *RPG* 2010; 17(3):151-157.
21. Rossoni RD, Vilela SFG, Forte LFBP, Jorge AOC, Junqueira JC. Photoinactivation of *Escherichia coli* using xanthene dyes and light-emitting diodes. *Braz. Dent. Sci* 2009; 12(4):6-11.
22. Siqueira Martins CPC, Toginho Filho DO, Lima FM, Silva FP, Durante H, Dias FL, Duarte JL, kashimoto RK, Bordinassi de Castro VA. Efeitos biológicos da luz: aplicação de terapia de baixa potência empregando LEDs (Light Emitting Diode) na cicatrização da úlcera venosa: relato de caso. *Ciências Biológicas e da Saúde* 2009; 30:37-46.
23. Hatakeyama T, Murayama Y, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto k, Ochiai T, Kokuba Y, Inoue K, Nakajima M, Otsuji E. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncology Reports* 2013; 29: 911-916.
24. Teichert MC, Jones J.W, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 2002; 93:155-160.

25. Khanal A, Bui Ngoc, MP, Seo SS. Microgel-Encapsulated Methylene Blue for the Treatment of Breast Cancer Cells by Photodynamic Therapy. *J Breast Cancer* 2014; 17:18-24.
26. Salvia ACR, Matilde F dos S, Rosa, FC, Kimpara ET, Jorge AO, Balducci I, et al. Disinfection protocols to prevent cross-contamination between dental offices and prosthetic laboratories. *J Infect Public Health* 2013; 6:377-382.
27. Noack J, Vogel A. Laser-Induced Plasma Formation in Water at Nanosecond to Femtosecond Time Scales: Calculation of Thresholds, Absorption Coefficients, and Energy Density. *IEEE J. Quant. Electron.* 1999; 35(8):1156-1167.

Figura 1. Aspecto interno do dispositivo de LED composto por 8 LEDs com potência de 1W utilizado para o experimento.



Figura 2. Aspecto interno do dispositivo de LED em funcionamento.



Figura 3. Exemplo da aplicação da terapia fotodinâmica sobre a prótese total no grupo experimental

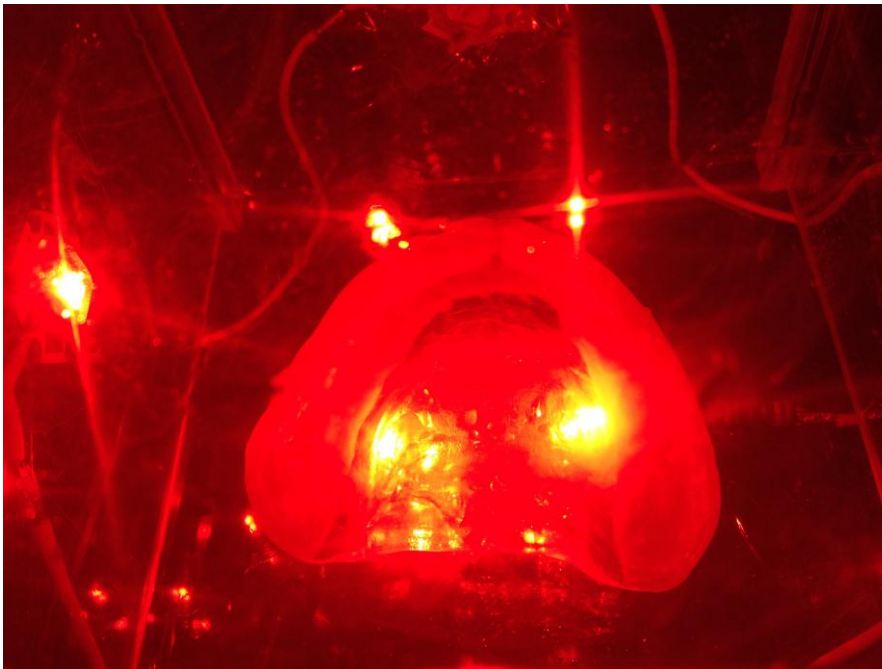


Figura 4. Mediana com intervalo interquartil dos escores obtidos da contagem de UFC/ml de bactérias totais viáveis presentes nas próteses totais avaliadas de cada grupo (letras diferentes: $p=0,0002$).

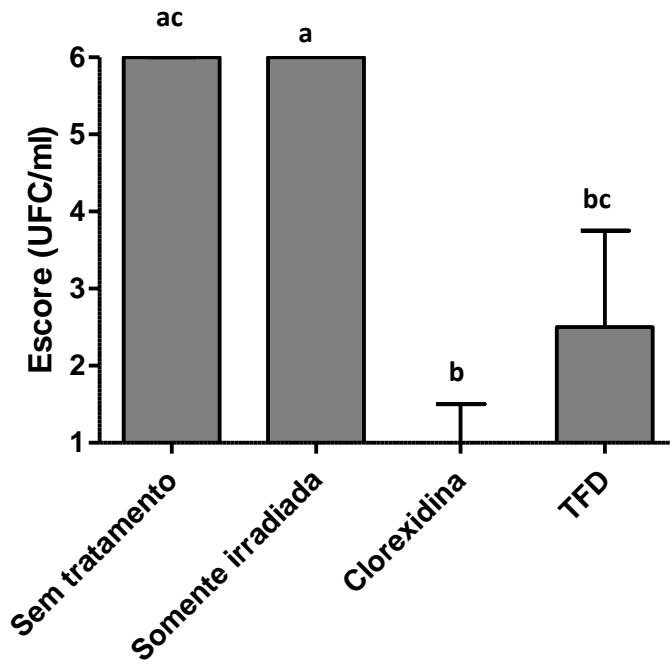


Figura 5. Média dos escores obtidos da contagem de UFC/ml de bactérias viáveis identificadas presentes nas próteses totais avaliadas de cada grupo (letras diferentes: $p < 0,001$).

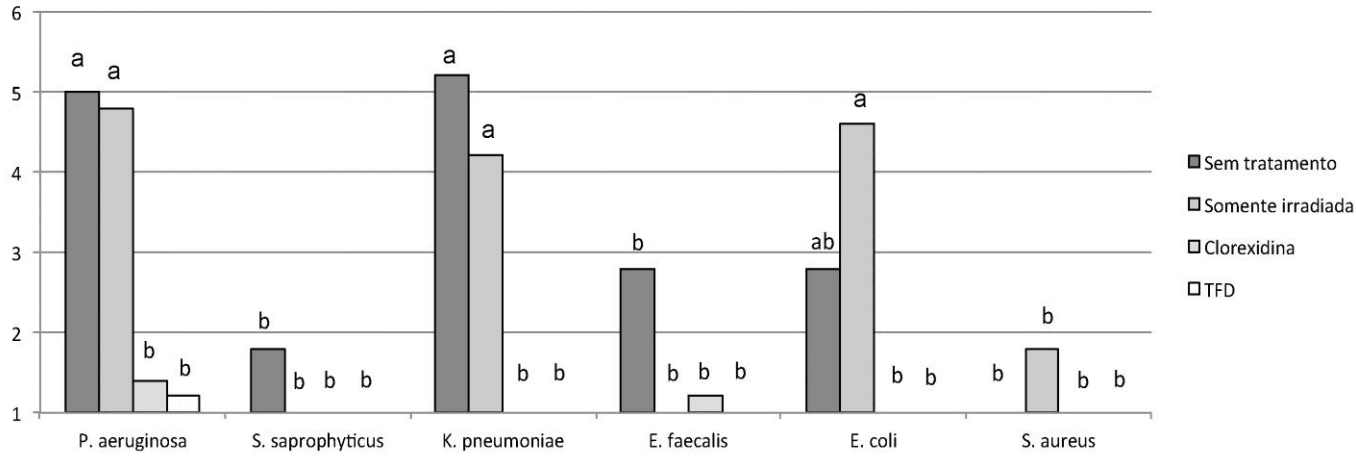


Figura 6. Mediana com intervalo interquartil dos escores obtidos da contagem de UFC/ml de fungos totais viáveis presentes nas próteses totais avaliadas de cada grupo (letras diferentes: $p=0,0002$).

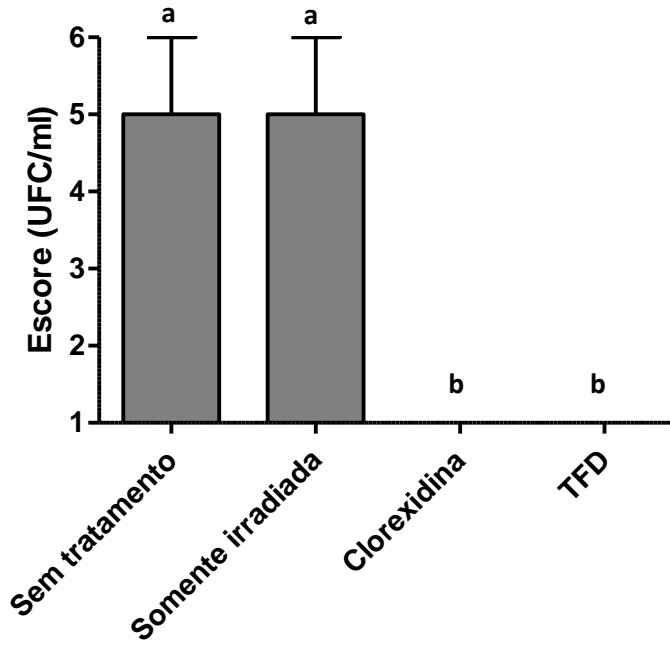


Figura 7. Aspecto da prótese total após ser irradiada e corada pelo fotossensibilizador.



4 CONCLUSÕES GERAIS

A revisão de literatura sistemática indicou que os agentes químicos para imersão hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2% e ácido acético 50-100% apresentaram uma boa eficácia mediante a contaminação de próteses acrílicas e; são os mais indicados, atualmente, para desinfecção de próteses acrílicas, não atuando como esterilizantes. Entretanto, mais estudos devem ser realizados em relação às alterações que estes meios podem causar às propriedades do material envolvido.

O estudo experimental demonstrou que as próteses acrílicas recém recebidas dos laboratórios protéticos mostraram um índice de contaminação relevante e heterogêneo de micro-organismos potencialmente patogênicos, exercendo fundamental papel na infecção cruzada entre laboratório e clínica. Espécies de bactérias identificadas *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E.coli* foram as mais prevalentes em ordem decrescente. Por meio dos resultados obtidos, e diante das limitações do estudo experimental, foi verificado que a terapia fotodinâmica antimicrobiana, no protocolo proposto de 6 minutos, apresentou viabilidade técnica para sua aplicação no combate à infecção cruzada entre laboratório protético e clínica odontológica, e vice-versa. A utilização do fotossensibilizador azul de metileno 22 µM associado ao equipamento protótipo composto por 8 LEDs de 630 nm e 1 W reduziu significativamente a contagem de micro-organismos encontrados nas próteses totais advindas de diferentes laboratórios protéticos, exercendo efeito semelhante à imersão por 10 minutos em digluconato de clorexidina 2%. O efeito apresentado é promissor, diante da possibilidade de ajustes na técnica, que poderão conduzir ao aumento do potencial antimicrobiano para espécies mais resistentes, possibilitando a esterilização de superfícies de resina acrílica.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABICHANDANI, S. J.; NADIGER, R. Cross contamination in dentistry: A comprehensive overview. **Chron. Young Sci.**, v. 4, p. 51-58, 2013.

ANVISA. RDC nº15, de março de 2012. Disponível em:<www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 10 abr. 2015.

CAMPANHA, N.; PAVARINA, A. C.; VERGANI, C.; MACHADO, A. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. **J. Prosthet. Dent.**, v. 93, n. 5, p. 483-487, 2005.

CHASSOT, A. L. C.; POISL, M. I. P.; SAMUEL, S. M. W. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. **Braz. Dent. J.**, v. 17, p. 117-121, 2006.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, D. G.; ADRIANO, C. S.; BAGNATO, V. S. Photodynamic inactivation of four candida species induced by photogem®. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, p. 42-49, 2010.

FRANCO, J. E. M.; CAI, S.; LIMA, L. A. P. A.; GONÇALVES, A. S.; CAMPOS, T. N. Avaliação da capacidade de descontaminação da terapia fotodinâmica no pós operatório imediato de implantes : estudo piloto. **RPG**, v.17, n.3, p. 151-157, 2010.

FREITAS-PONTES, K. M.; GOMES, C. E.; DE CARVALHO, B. M.; SABÓIA, R. D.; GARCIA, B. A. Photosensitization of in vitro biofilms formed on denture base resin. **J. Prosthetic Dent.**, v. 14, p. 30-34, 2014.

FROTA, B. M. D. **Terapia fotodinâmica antimicrobiana aplicada em espécimes de resina acrílica confeccionados em diferentes laboratórios de prótese dentária**. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2012.

GANASHI, S.; GUJJARI, A. K.; SHYLESH KUMAR, B. S.; RAVI, M. B.; SOWMYA, S.; MEENAKSHI, S. Comparative Study to Assess the Effectiveness of Various Disinfectants on two Microorganisms and the effect of same on Flexural Strength of Acrylic Denture Base Resin - An In Vitro Study. **J. Int. Oral Health**, v. 5, n. 3, p. 55-62, 2013.

HATAKEYAMA, T.; MURAYAMA, Y.; KOMATSU, S.; SHIOZAKI, A.; KURIU, Y.; IKOMA, H.; NAKANISHI, M.; ICHIKAWA, D.; FUJIWARA, H.; OKAMOTO, k.; OCHIAI, T.; KOKUBA, Y.; INOUE, K.; NAKAJIMA, M.; OTSUJI, E. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. **Oncol. Rep.**, v. 29, p. 911-916, 2013.

HIRT, H.; SCHLIEVERT, M. P.; DUNNY, M. G. In Vivo Induction of Virulence and Antibiotic Resistance Transfer in Enterococcus faecalis Mediated by the Sex Pheromone-Sensing System of pCF10. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 716-723, 2002.

KHANAL, A.; BUI, M. P.; SEO, S. S. Microgel-Encapsulated Methylene Blue for the Treatment of Breast Cancer Cells by Photodynamic Therapy. **J. Breast Cancer**, v. 17, p. 18-24, 2014.

MYABE, M.; JUNQUEIRA, J. C.; COSTA, A. C. B. O.; JORGE, A. O.C.; RIBEIRO, M. S.; FEIST, I. S. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of staphylococcus spp. **Braz. Oral Res.**, v. 25, n. 3, p. 230-234, 2011.

NIRALE, R. M.; THOMBRE, R.; KUBASAD, G. Comparative evaluation of sodium hypochlorite and microwave disinfection on dimensional stability of denture bases. **J. Adv. Prosthodont.**, v. 4, p. 24-29, 2012.

PAVARINA, A. C.; NEPPELENBROEK, K. H.; MIMA, E. G. O.; SPOLIDORIO, D. M. P.; GIAMPAOLO, E. T.; VERGANI, C. E. Efetividade da irradiação por micro-ondas na desinfecção de resinas reembasadoras rígidas e resina acrílica para base de prótese. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 35, n. 4, p. 305-311, 2006.

PAVARINA, A. C.; JORGE, J. H.; GIAMPAOLO, E. T.; VERGANI, C. E.; MACHADO, A. L.; RODRIGUEZ, M. G. Efeito da desinfecção em microondas sobre a microinfiltração na interface de resinas para base e reembasamento de próteses. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 36, n. 3, p. 261-266, 2007.

RIBEIRO, D. G.; PAVARINA, A. C.; DOVIGO, L. N.; MIMA, E. G.; MACHADO, A. L.; BAGNATO, V. S.; VERGANI, C. E. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures: a clinical investigation. **Lasers Med. Sci.**, v. 27, p. 161-168, 2012.

ROSSONI, R. D.; VILELA, S. F. G.; FORTE, L. F. B. P.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. Photoinactivation of Escherichia coli using xanthene dyes and light-emitting diodes. **Braz. Dent. Sci.**, v. 12, n. 4, p. 6-11, 2009.

SALES, D. C. T.; MORAES FILHO, J. P.; ESTEVES, R. A. Avaliação da contaminação cruzada durante o polimento das próteses nos laboratórios de prótese dentária em Belém-Pará. **PCL: Rev. Bras. de Prótese Clínica e Laboratorial**, v. 5, n. 27, p. 417-424, 2003.

SALVIA, A. C. R.; MATILDE, F. S.; ROSA, F. C.; KIMPARA, E. T.; JORGE, A. O.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y. Disinfection protocols to prevent cross-contamination between dental offices and prosthetic laboratories. **J. Infect. Public Health**, v. 6, n. 5, p. 377-382, 2013.

SEO, R. S.; VERGANI, C. E.; PAVARINA, A. C.; COMPAGNONI, M. A.; MACHADO, A. L. Influence of microwave disinfection on the dimensional stability of intact and relined acrylic resin denture bases. **J. Prosthet. Dent.**, v. 98, n. 3, p. 216-223, 2007.

SESMA, N.; ROCHA, A. L.; LAGANÁ, D. C.; COSTA, B.; MORIMOTO, S. Effectiveness of Denture Cleanser Associated With Microwave Disinfection and Brushing of Complete Dentures: In Vivo Study. **Braz. Dental J.**, v. 24, n. 4, p. 357-361, 2013.

SILVA, F. C.; KIMPARA, T. E.; MANCINI, M. N. G.; BALDUCCI, I.; CARDOSO JORGE, A. O.; KOGA-ITO, C. Y. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. **J. Prosthodont.**, v. 17, p. 627-633, 2008.

SILVA, M. C. V. S.; CARTAXO, J. U. Q.; ARIOLI FILHO, J. N.; BATISTA, A. U. D. Evaluation of the biosecurity measures adopted in dental prosthesis laboratories of the city of João Pessoa, PB, Brazil. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v. 10, p. 101-106, 2010.

SIQUEIRA MARTINS, C .P. C.; TOGINHO FILHO, D. O.; LIMA, F. M.; SILVA, F. P.; DURANTE, H.; DIAS, F. L.; DUARTE, J. L.; KASHIMOTO, R. K.; BORDINASSI DE CASTRO, V. A. Efeitos biológicos da luz: aplicação de terapia de baixa potência empregando LEDs (Light Emitting Diode) na cicatrização da úlcera venosa: relato de caso. **Semina Ciênc. Biol. Saúde**, v. 30, n. 1, p. 37-46, 2009.

SMITH, P. N.; PALENICK, C. J.; BLANCHARD, S. B. Microbial Contamination and the Sterilization/Disinfection of Surgical Guides Used in the Placement of Endosteal Implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 26, p. 274-281, 2011.

TÁVORA, F. F. F. **Efeito de sucessivos ciclos de desinfecção por micro-ondas sobre a microdureza e rugosidade superficial de diferentes bases de próteses totais**. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

TEICHERT, M. C.; JONES, J. W.; USACHEVA, M. N.; BIEL, M. A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 93, p. 155-160, 2002.

TEMÓTEO, G. D. A. **Avaliação da contaminação cruzada entre diferentes laboratórios de prótese dentária e a clínica odontológica**. 2014. 52 f. **Dissertação** (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

WILLIAMS, D. W.; CHAMARY, N.; LEWS, M. A. O.; MILWARD, P. J.; MCANDREW, R. Microbial contamination of removable prosthodontics appliances from laboratories and impact of clinical storage. **Br. Dental J.**, v. 211, p. 163-166, 2011.

APÊNDICE A

BACTÉRIAS TOTAIS VIÁVEIS:

Tabela. Dados em escore – UFC/ml de bactérias totais viáveis:

Sem tratamento	Somente irradiada	Clorexidina	TFD
5.	6.	2.	2.
5.	6.	1.	1.
5.	6.	1.	2.
6.	6.	1.	5.
6.	6.	1.	3.
6.			4.
6.			3.
			1.

Quadro. Estatística descritiva.

	Sem tratamento	Somente irradiada	Clorexidina	TFD
Number of values	7	5	5	8
Minimum	5.000	6.000	1.000	1.000
25% Percentile	5.000	6.000	1.000	1.250
Median	6.000	6.000	1.000	2.500
75% Percentile	6.000	6.000	1.500	3.750
Maximum	6.000	6.000	2.000	5.000
Mean	5.571	6.000	1.200	2.625
Std. Deviation	0.5345	0.0	0.4472	1.408
Std. Error	0.2020	0.0	0.2000	0.4978
Lower 95% CI	5.077	6.000	0.6447	1.448
Upper 95% CI	6.066	6.000	1.755	3.802

TFA= terapia fotodinâmica antimicrobiana.

Quadro. Testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$).

Kruskal-Wallis test			
P value	0.0002		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	4		
Kruskal-Wallis statistic	20.16		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Sem tratamento vs Somente irradiada	-2.786	No	ns
Sem tratamento vs Clorexidina	13.81	Yes	**
Sem tratamento vs TFD	9.402	No	ns
Somente irradiada vs Clorexidina	16.60	Yes	**
Somente irradiada vs TFD	12.19	Yes	*
Clorexidina vs TFD	-4.413	No	ns

FUNGOS TOTAIS VIÁVEIS:

Tabela. Dados em escore – UFC/ml de fungos totais viáveis:

Sem tratamento	Somente irradiada	Clorexidina	TFD
5.	6.	2.	1.
5.	5.	1.	1.
5.	5.	1.	2.
6.	6.	1.	1.
5.	5.	1.	1.
6.			1.
6.			2.
			1.

Quadro. Estatística descritiva.

	Sem tratamento	Somente irradiada	Clorexidina	TFD
Number of values	7	5	5	8
Minimum	5.000	5.000	1.000	1.000
25% Percentile	5.000	5.000	1.000	1.000
Median	5.000	5.000	1.000	1.000
75% Percentile	6.000	6.000	1.500	1.750
Maximum	6.000	6.000	2.000	2.000
Mean	5.429	5.400	1.200	1.250
Std. Deviation	0.5345	0.5477	0.4472	0.4629
Std. Error	0.2020	0.2449	0.2000	0.1637
Lower 95% CI	4.934	4.720	0.6447	0.8630
Upper 95% CI	5.923	6.080	1.755	1.637

Quadro. Testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$).

Kruskal-Wallis test			
P value	0.0002		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	4		
Kruskal-Wallis statistic	19.88		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Sem tratamento vs Somente irradiada	0.1714	No	ns
Sem tratamento vs Clorexidina	12.77	Yes	*
Sem tratamento vs TFD	12.45	Yes	**
Somente irradiada vs Clorexidina	12.60	Yes	*
Somente irradiada vs TFD	12.28	Yes	*
Clorexidina vs TFD	-0.3250	No	ns

BACTÉRIAS IDENTIFICADAS VIÁVEIS:

Tabela. Dados em escore (média)– UFC/ml de bactérias totais viáveis identificadas:

	P. aeruginosa	S. saprophyticus	K. pneumoniae	E. faecalis	E. coli	S. aureus
Sem tratamento	5	1.8	5.2	2.8	2.8	1
Somente irradiada	4.8	1	4.2	1	4.6	1.8
Clorexidina	1.4	1	1	1.2	1	1
TFD	1.2	1	1	1	1	1

Quadro. Teste de análise de variância 2 critérios ($\alpha=0,05$).

Two-way RM ANOVA		Matching by cols			
Source of Variation		% of total variation		P value	
Interaction		20.57		< 0.0001	
Microorganismos		17.55		< 0.0001	
Tratamento		27.66		< 0.0001	
Subjects (matching)		4.8382		0.6561	
Source of Variation		P value summary		Significant?	
Interaction		***		Yes	
Microorganismos		***		Yes	
Tratamento		***		Yes	
Subjects (matching)		ns		No	
Source of Variation		Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction		15	83.90	5.593	3.733
Microorganismos		5	71.57	14.31	9.553
Tratamento		3	112.8	37.60	30.49
Subjects (matching)		16	19.73	1.233	0.8231
Residual		80	119.9	1.498	
Number of missing values		0			
Bonferroni post tests					
Sem tratamento vs Somente irradiada					
Tratamento		Sem tratamento	Somente irradiada	Difference	95% CI of diff.
Pseudomonas aeruginosa		5.000	4.800	-0.2000	-2.711 to 2.311
Staphylococcus saprophyticus		1.800	1.000	-0.8000	-3.311 to 1.711
Klebsiella pneumoniae		5.200	4.200	-1.000	-3.511 to 1.511
Enterococcus faecalis		2.800	1.000	-1.800	-4.311 to 0.7114
Escherichia coli		2.800	4.600	1.800	-0.7114 to 4.311
Staphylococcus aureus		1.000	1.800	0.8000	-1.711 to 3.311
Tratamento		Difference	t	P value	Summary
Pseudomonas aeruginosa		-0.2000	0.2622	P > 0.05	ns
Staphylococcus saprophyticus		-0.8000	1.049	P > 0.05	ns
Klebsiella pneumoniae		-1.000	1.311	P > 0.05	ns
Enterococcus faecalis		-1.800	2.360	P > 0.05	ns
Escherichia coli		1.800	2.360	P > 0.05	ns
Staphylococcus aureus		0.8000	1.049	P > 0.05	ns
Sem tratamento vs Clorexidina					
Tratamento		Sem tratamento	Clorexidina	Difference	95% CI of diff.
Pseudomonas aeruginosa		5.000	1.400	-3.600	-6.111 to -1.089

Staphylococcus saprophyticus	1.800	1.000	-0.8000	-3.311 to 1.711
Klebsiella pneumoniae	5.200	1.000	-4.200	-6.711 to -1.689
Enterococcus faecalis	2.800	1.200	-1.600	-4.111 to 0.9114
Escherichia coli	2.800	1.000	-1.800	-4.311 to 0.7114
Staphylococcus aureus	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Tratamento	Difference	t	P value	Summary
Pseudomonas aeruginosa	-3.600	4.720	P<0.001	***
Staphylococcus saprophyticus	-0.8000	1.049	P > 0.05	ns
Klebsiella pneumoniae	-4.200	5.507	P<0.001	***
Enterococcus faecalis	-1.600	2.098	P > 0.05	ns
Escherichia coli	-1.800	2.360	P > 0.05	ns
Staphylococcus aureus	0.0	0.0	P > 0.05	ns
Sem tratamento vs TFD				
Tratamento	Sem tratamento	TFA	Difference	95% CI of diff.
Pseudomonas aeruginosa	5.000	1.200	-3.800	-6.311 to -1.289
Staphylococcus saprophyticus	1.800	1.000	-0.8000	-3.311 to 1.711
Klebsiella pneumoniae	5.200	1.000	-4.200	-6.711 to -1.689
Enterococcus faecalis	2.800	1.000	-1.800	-4.311 to 0.7114
Escherichia coli	2.800	1.000	-1.800	-4.311 to 0.7114
Staphylococcus aureus	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Tratamento	Difference	t	P value	Summary
Pseudomonas aeruginosa	-3.800	4.982	P<0.001	***
Staphylococcus saprophyticus	-0.8000	1.049	P > 0.05	ns
Klebsiella pneumoniae	-4.200	5.507	P<0.001	***
Enterococcus faecalis	-1.800	2.360	P > 0.05	ns
Escherichia coli	-1.800	2.360	P > 0.05	ns
Staphylococcus aureus	0.0	0.0	P > 0.05	ns
Somente irradiada vs Clorexidina				
Tratamento	Somente irradiada	Clorexidina	Difference	95% CI of diff.
Pseudomonas aeruginosa	4.800	1.400	-3.400	-5.911 to -0.8886
Staphylococcus saprophyticus	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Klebsiella pneumoniae	4.200	1.000	-3.200	-5.711 to -0.6886
Enterococcus faecalis	1.000	1.200	0.2000	-2.311 to 2.711
Escherichia coli	4.600	1.000	-3.600	-6.111 to -1.089
Staphylococcus aureus	1.800	1.000	-0.8000	-3.311 to 1.711
Tratamento	Difference	t	P value	Summary
Pseudomonas aeruginosa	-3.400	4.458	P<0.001	***
Staphylococcus saprophyticus	0.0	0.0	P > 0.05	ns
Klebsiella pneumoniae	-3.200	4.196	P<0.001	***
Enterococcus faecalis	0.2000	0.2622	P > 0.05	ns
Escherichia coli	-3.600	4.720	P<0.001	***
Staphylococcus aureus	-0.8000	1.049	P > 0.05	ns
Somente irradiada vs TFD				
Tratamento	Somente irradiada	TFA	Difference	95% CI of diff.
Pseudomonas aeruginosa	4.800	1.200	-3.600	-6.111 to -1.089
Staphylococcus saprophyticus	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Klebsiella pneumoniae	4.200	1.000	-3.200	-5.711 to -0.6886
Enterococcus faecalis	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Escherichia coli	4.600	1.000	-3.600	-6.111 to -1.089
Staphylococcus aureus	1.800	1.000	-0.8000	-3.311 to 1.711
Tratamento	Difference	t	P value	Summary
Pseudomonas aeruginosa	-3.600	4.720	P<0.001	***
Staphylococcus saprophyticus	0.0	0.0	P > 0.05	ns
Klebsiella pneumoniae	-3.200	4.196	P<0.001	***
Enterococcus faecalis	0.0	0.0	P > 0.05	ns
Escherichia coli	-3.600	4.720	P<0.001	***

Staphylococcus aureus	-0.8000	1.049	P > 0.05	ns
Clorexidina vs TFD				
Tratamento	Clorexidina	TFA	Difference	95% CI of diff.
Pseudomonas aeruginosa	1.400	1.200	-0.2000	-2.711 to 2.311
Staphylococcus saprophyticus	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Klebsiella pneumoniae	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Enterococcus faecalis	1.200	1.000	-0.2000	-2.711 to 2.311
Escherichia coli	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Staphylococcus aureus	1.000	1.000	0.0	-2.511 to 2.511
Summary				
Tratamento	Difference	t	P value	Summary
Pseudomonas aeruginosa	-0.2000	0.2622	P > 0.05	ns
Staphylococcus saprophyticus	0.0	0.0	P > 0.05	ns
Klebsiella pneumoniae	0.0	0.0	P > 0.05	ns
Enterococcus faecalis	-0.2000	0.2622	P > 0.05	ns
Escherichia coli	0.0	0.0	P > 0.05	ns
Staphylococcus aureus	0.0	0.0	P > 0.05	ns

APÊNDICE B

Figura 1: Exemplo de crescimento bacteriano quanto ao controle negativo (próteses totais sem tratamento prévio) no meio de cultura Ágar Sangue



Figura 2: Exemplo de crescimento bacteriano quanto ao controle negativo no meio de cultura HiCrome UTI Agar®

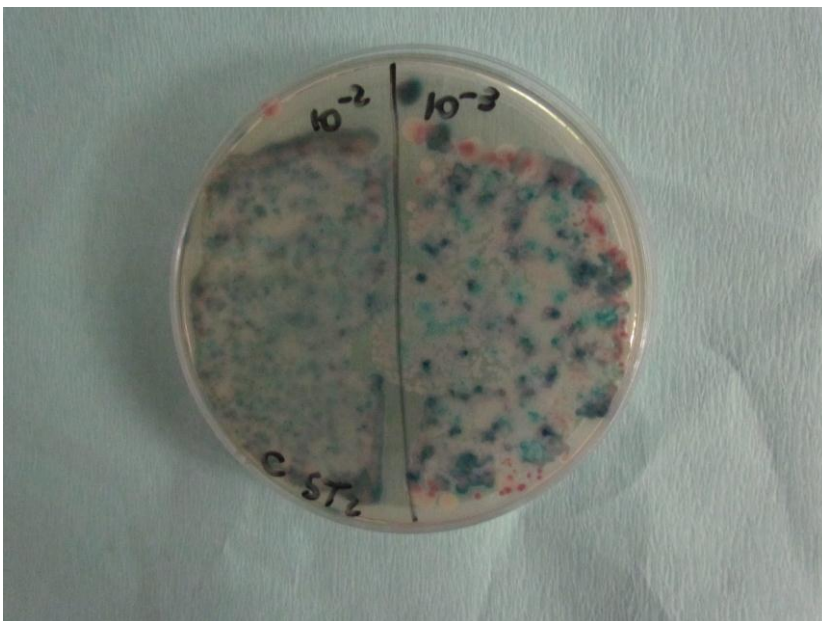


Figura 3: Exemplo de crescimento de fungos quanto ao controle negativo no meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar



Figura 4: Exemplo de ausência de crescimento de bactérias viáveis frente à Terapia Fotodinâmica no meio de cultura Ágar Sangue.



Figura 5: Exemplo de ausência de crescimento de bactérias identificadas viáveis frente à Terapia Fotodinâmica no meio de cultura HiCrome UTI Agar®



Figura 6: Exemplo de ausência de crescimento de fungos e leveduras frente à Terapia Fotodinâmica no meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar

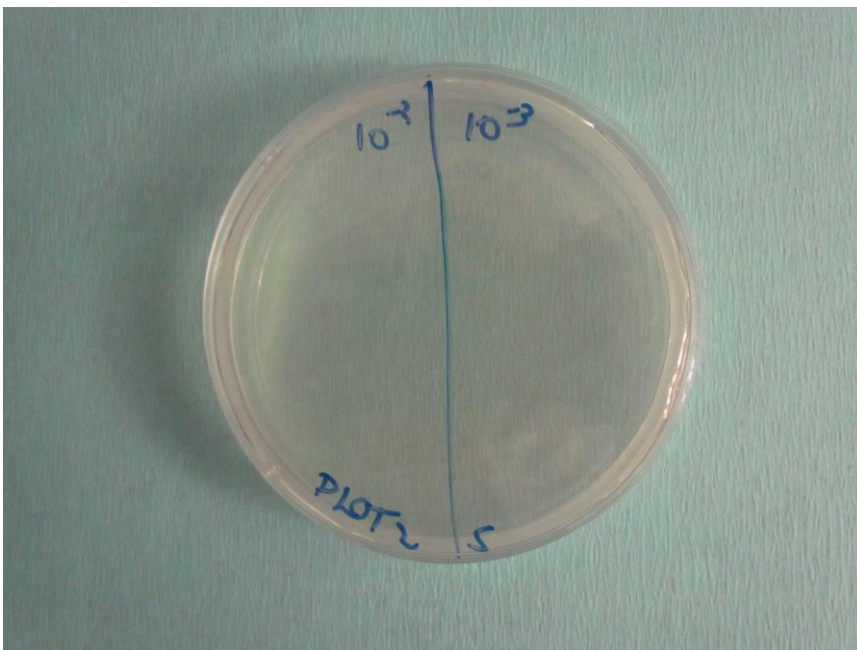


Figura 7: Exemplo da irradiação da prótese total após ter sido corada.

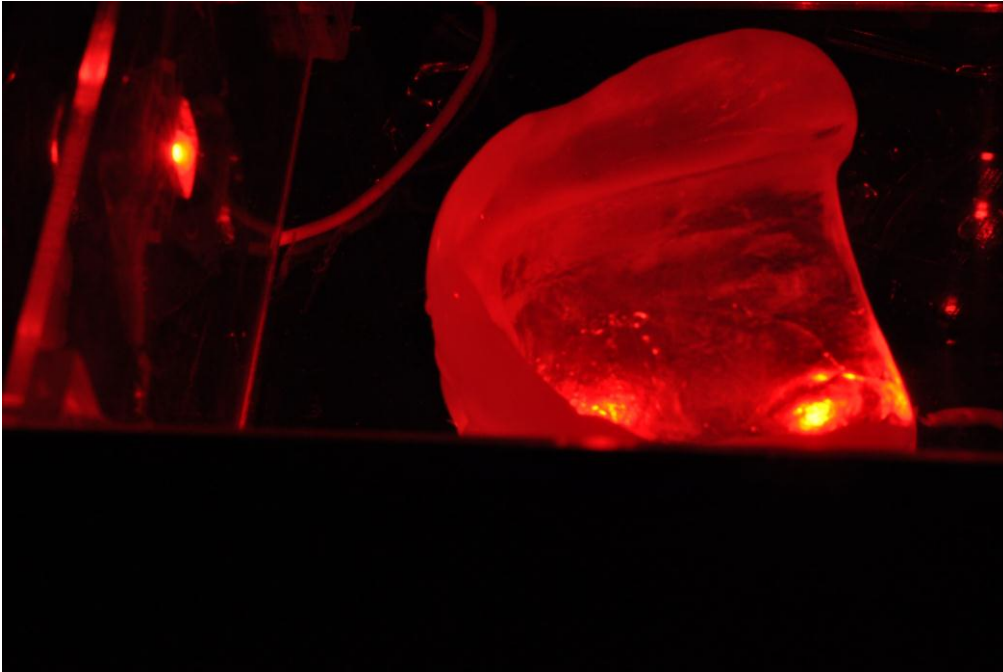


Figura 8: Exemplo da imersão da prótese total no meio de cultura BHI caldo em cuba ultrassônica por 15 minutos após tratamento realizado.

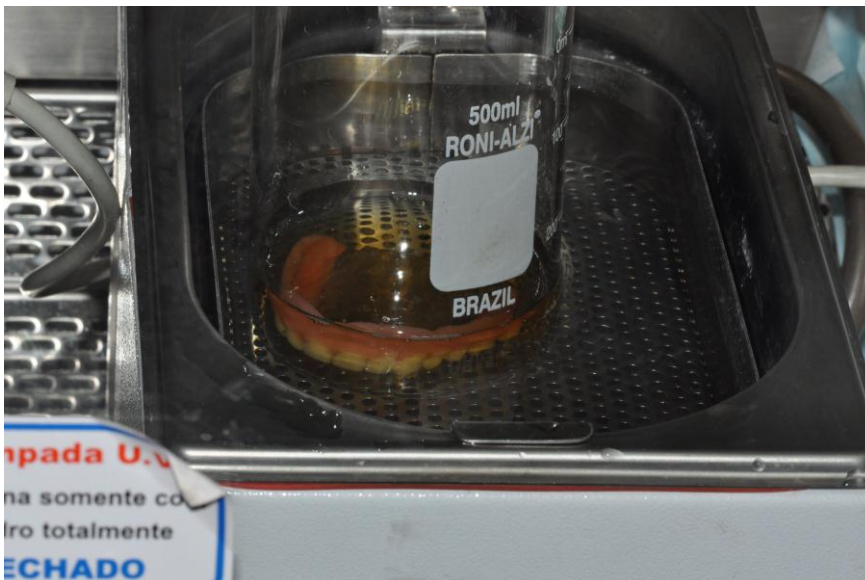
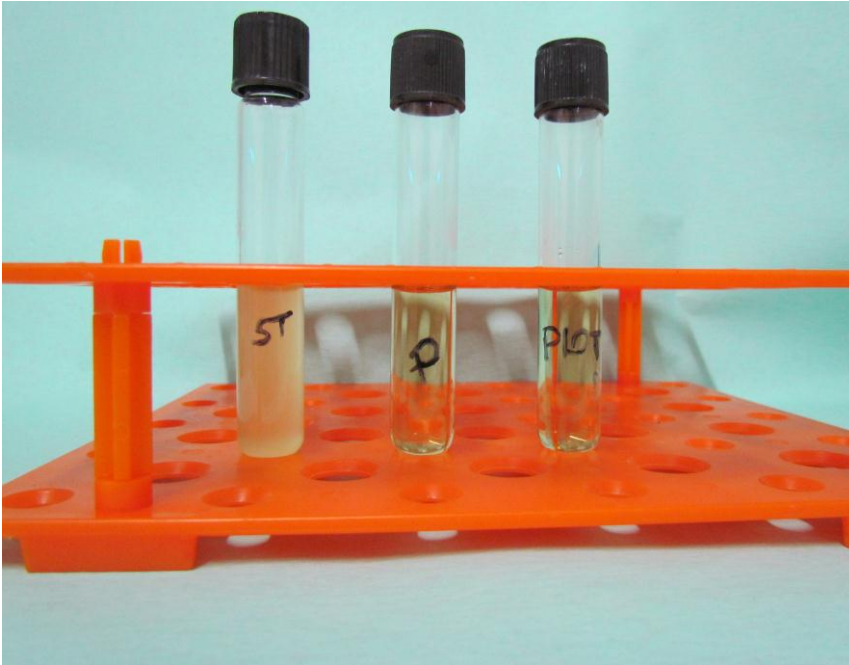


Figura 9: Exemplo da coleta de 5ml de solução para incubação em estufa CO₂ por 48 horas.



Figura 10: Exemplo do aspecto do meio de cultura BHI caldo cultivado a 37°C por 48hrs em estufa de CO₂, no grupo controle negativo, controle positivo e grupo experimental.



ANEXO

TABELA 1. Identificação dos micro-organismos através do meio de cultura HiCrome UTI Agar® (Himedia, New York, USA).

Cor Típica da Colônia	Micro-organismo pré-identificado
Roxo	<i>Escherichia coli</i>
Azul Turquesa	<i>Enterococcus faecalis</i>
Azul Metálico	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Marrom claro	<i>Proteus mirabilis</i>
Creme, translúcida (pigmento esverdeado pode ser observado)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Dourada, opaca, pequena	<i>Staphylococcus aureus</i>