

EFETIVIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLOREXIDINA NA DESINFECÇÃO DE PRÓTESES TOTAIS CONTAMINADAS POR *C. albicans*.

Larice Gabriela Bachette, Ana Cláudia Pavarina, Ewerton Garcia de Oliveira Mima, Denise Madalena Palomari Spolidório, Eunice Teresinha Giampaolo, Ana Lucia Machado. – Ciências Biológicas – Odontologia – Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Campus de Araraquara

A utilização de próteses pode alterar a microbiota oral tanto quantitativa como qualitativamente, expondo o paciente a um maior risco de cárie, doença periodontal e inflamação na mucosa. A estomatite protética ou candidose é uma infecção fúngica causada por microrganismos do gênero *Candida* spp. que frequentemente acomete até 65% dos usuários de prótese total. A estomatite protética é caracterizada por múltiplos pontos hiperêmicos da mucosa palatina e, em casos mais avançados, também podem ser observadas áreas eritematosas difusas ou ainda hiperplasia do palato. Os sintomas da estomatite causada por prótese podem incluir ardência, prurido, dor, desconforto generalizado na cavidade bucal, alteração no paladar e lesões associadas, como queilite angular. Essa condição patogênica é causada principalmente por fatores microbianos, sendo a *Candida albicans* a espécie mais encontrada. Esses microrganismos podem colonizar a cavidade bucal, uma vez que apresentam capacidade de aderência às células epiteliais e à resina da base das próteses. Além disso, independentemente do tipo de acabamento utilizado, podem penetrar e sobreviver a uma profundidade que varia de 1,0 a 2,0 micrometros e reinfetar a mucosa do paciente via prótese. A solução de clorexidina tem sido sugerida como tratamento alternativo para Candidose em substituição aos antifúngicos. Enquanto a solução a 0,2% tem sido utilizada como bochecho no tratamento de Candidose, a solução a 2% por 30 minutos é utilizada como desinfetante para imersão noturna da prótese¹. Segundo estudos, o efeito inibitório da solução de clorexidina foi maior em concentrações maiores que 1,5%, quando o número de leveduras aderentes foi reduzido para 85%². Em estudo anterior foi verificado que a solução de clorexidina a 4% demonstrou ser efetiva na desinfecção de próteses totais contaminadas com *C. albicans*³. Considerando estes aspectos, julgamos importante avaliar *in vitro* a efetividade de menores concentrações da solução de clorexidina (2% e 1%) na desinfecção de próteses totais contaminadas com *C. albicans*.

Com o objetivo de simular as condições clínicas de desinfecção, foram confeccionadas 28 próteses totais superiores de resina acrílica termopolimerizável. Para a obtenção dessas próteses, inicialmente foi confeccionado um molde de silicone industrial RTV a partir de um modelo padrão que simulava um rebordo alveolar desdentado superior (Figura 1). A partir dessa matriz, foram confeccionados modelos idênticos em gesso pedra tipo IV. Para a confecção dos modelos, o gesso foi espatulado manualmente, utilizando-se a proporção água/pó indicada pelo fabricante (22 mL/100 g). O gesso foi vazado sob vibração leve e constante, e, após a sua presa (45 min), os modelos foram retirados do molde de silicone RTV, e suas bases aplainadas com lixas d'água.

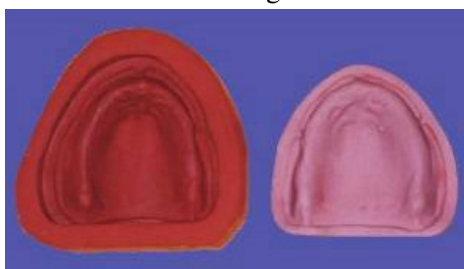


FIGURA 1: Molde de RTV e modelo de gesso

A seguir, sobre um dos modelos de gesso, foi realizado o enceramamento de uma prótese total. Para isso, o modelo foi isolado com isolante para resina acrílica à base de alginato e sobre esse modelo foi confeccionada uma base de prova com resina acrílica quimicamente ativada e lâminas de cera rosa nº 7. A

resina acrílica, manipulada de acordo com as orientações do fabricante, foi acomodada sobre o modelo. Em seguida, um rolete foi confeccionado com uma lâmina e meia de cera rosa nº 7 dobrada no sentido longitudinal, em forma de sanfona, em faixas de 1 cm de largura. O acabamento do rolete de cera rosa nº 7 foi realizado com uma espátula nº 36 aquecida. Posteriormente, os dentes artificiais Biotone, modelo 3D/30L, cor 66, foram montados, e a escultura realizada na seguinte seqüência: enceramento, recorte do colo gengival, delineamento dos sulcos horizontais, esboço das bossas radiculares, acabamento da escultura e flambagem com lâmpada de chama horizontal que contribuiu para a obtenção de uma superfície de cera lisa e brilhante (Figura 2).



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

Posteriormente, foi confeccionada uma matriz de silicone RTV pela moldagem dessa prótese total encerada para permitir o enceramento padronizado de cada uma das bases de prótese sobre os modelos de gesso. Conjuntos completos de dentes artificiais anteriores e posteriores, idênticos aos utilizados no enceramento da base de prótese, foram colocados nas suas lojas correspondentes da matriz de silicone e, a seguir, foi vertida cera rosa nº 7 no estado fluido dentro da matriz. Imediatamente após, o modelo de gesso foi posicionado sobre o molde, e se aguardou o tempo de resfriamento/endurecimento da cera. O conjunto modelo, base de cera e dentes artificiais, foi retirado do molde de silicone e, a seguir, foi realizado o acabamento da escultura com o objetivo de remover porções de cera que recobriam os dentes artificiais, mantendo-os limpos e livres de qualquer excesso do material. Além disso, as regiões das bossas e das papilas interdentais foram arredondadas com o auxílio da lâmpada de chama horizontal que também contribuiu para a obtenção de uma superfície de cera lisa e brilhante. A seguir, realizou-se o processamento laboratorial de cada prótese encerada, juntamente com o modelo. Inicialmente, as próteses foram incluídas em mufla nº 6. Após inclusão em mufla e presa do gesso, a cera foi removida e o gesso da mufla e contra-mufla foi isolado com isolante para resina acrílica. A seguir, resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550 foi proporcionada (21 gramas de pó/10 mL de líquido), manipulada de acordo com as recomendações do fabricante e acomodada no interior do molde de gesso da mufla. A prensagem foi realizada em duas etapas (prensagem de prova e prensagem final) em prensa hidráulica. A mufla foi levada a uma polimerizadora, foi realizado o ciclo curto de polimerização indicado pelo fabricante, em que a mufla foi imersa em água à temperatura de 73°C por 90 minutos, a seguir, a temperatura foi elevada para 96°C por 30 minutos. Finalmente, a prótese foi demuflada e submetida a acabamento para remoção de irregularidades e polimento final, utilizando-se pedra trimer, lixa d'água, pedra pomes e branco de Espanha (Figura 3).



FIGURA 3: Prótese total após acabamento e polimento

Logo após a confecção, todas as próteses foram colocadas em embalagens individuais e submetidas à esterilização por óxido de etileno (ACECIL – Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda., Campinas, SP – Brasil). É importante ressaltar que essas próteses somente foram manipuladas 15 dias após a esterilização, uma vez que esse período é necessário para a liberação do gás de óxido de etileno absorvido, impedindo assim a invalidação dos resultados microbiológicos.

Em seguida, para contaminação das próteses, o microrganismo *C. albicans* (ATCC 60193) foi inoculado em 10 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB) e incubado a 37°C por 24 horas. Após esse período, os tubos de ensaio foram agitados e o grau de turvação do meio foi avaliado por meio da correlação com os padrões da escala de McFarland. Assim, foi possível obter uma alíquota do meio de cultura inoculado correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^7 ufc/mL do microrganismo avaliado. As próteses foram colocadas em béqueres contendo 200 mL de meio de cultura TSB. A seguir, cada prótese foi inoculada com a alíquota correspondente a 10^7 ufc/mL do microrganismo testado. Esses béqueres foram agitados e incubados a 37°C por 24 horas. Após a contaminação, as próteses foram divididas em três grupos, com 8 amostras cada. No grupo controle, as próteses não foram desinfetadas, e nos grupos experimentais as próteses foram imersas por 10 minutos em solução de clorexidina a 2% ou 1%. As próteses pertencentes ao grupo controle foram assepticamente removidas do béquer com o meio de cultura e colocadas individualmente em um béquer contendo 200 mL de solução salina, permanecendo por 10 minutos. Em seguida, cada prótese foi assepticamente transferida para outro béquer com 200 mL de solução salina, que foi agitado por 1 minuto e deixado em repouso por 9 minutos. Posteriormente, os béqueres foram levemente agitados para resuspender as células microbianas, e as diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram obtidas. Uma alíquota de 25 μ L de cada uma dessas diluições foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura específico para *C. albicans*, Sabouraud Dextrose Agar com 5 μ g/mL de cloranfenicol. É importante enfatizar que os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicatas. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para se verificar o crescimento de colônias. As próteses dos grupos experimentais foram submetidas ao procedimento de desinfecção com a solução de clorexidina 2% ou 1%. Para isso, após os procedimentos de contaminação e incubação previamente descritos, as próteses foram removidas dos béqueres e imersas individualmente em um béquer contendo 200 mL de solução de clorexidina 2% ou 1%, permanecendo por 10 minutos. Após a desinfecção, cada prótese foi assepticamente removida do béquer com a solução desinfetante e colocada em um béquer contendo 200 mL de solução salina. A seguir, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para obtenção das diluições seriadas e para a realização de semeadura utilizada para as amostras do grupo controle. As placas referentes aos grupos experimentais foram igualmente submetidas à incubação a 37°C por 48 horas. Para verificação da efetividade do método de desinfecção em longo prazo, as próteses submetidas à desinfecção por clorexidina foram colocadas individualmente em um béquer contendo 200 mL de TSB e neutralizador de clorexidina (0,87% de Lecitina e 0,5% de Tween 80), as quais foram incubadas em estufa a 37°C por 7 dias. A lecitina e o Tween 80 foram adicionados ao meio de cultura com a finalidade de se neutralizar o efeito residual (substatividade) da clorexidina, permitindo-se avaliar o efeito desinfetante da clorexidina somente durante o período de imersão (10 min) das amostras. Após a incubação de 48 horas, tanto as placas das amostras desinfetadas quanto as não desinfetadas foram submetidas à contagem de colônias em contador de colônias digital para determinação dos valores de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL).

Os resultados demonstraram que as placas referentes às amostras do grupo controle apresentaram crescimento microbiológico após incubação por 48 horas. Foi verificada uma média de $33,75 \times 10^4$ ufc/mL para as amostras desse grupo (Tabela 1). Para os grupos experimentais, apenas uma amostra de cada grupo apresentou crescimento de uma única colônia (2×10^2 ufc/mL). Para as demais amostras dos grupos experimentais, os valores de ufc/mL foram nulos (Tabela 1), o que tornou desnecessária, portanto, uma análise estatística inferencial para avaliação dos dados.

Tabela 1 – Valores de ufc/mL após 48 h referentes aos grupos controle e experimentais.

Amostras	Controle	Clorexidina 2%	Clorexidina 1%
1	$1,22 \times 10^6$	0*	0*
2	$2,80 \times 10^4$	0*	0
3	$8,40 \times 10^4$	0*	$2,00 \times 10^2$ *
4	$4,60 \times 10^4$	0*	0*
5	$1,80 \times 10^4$	0	0*
6	$1,24 \times 10^6$	$2,00 \times 10^2$ *	0*
7	$3,60 \times 10^4$	0	0*
8	$2,80 \times 10^4$	0*	0*

*: turvação em TSB após incubação por 7 dias.

Após incubação por 7 dias das próteses submetidas ao procedimento de desinfecção, seis amostras do grupo clorexidina 2% (75%) apresentaram turvação em TSB, enquanto que sete amostras do grupo clorexidina 1% (87,5%) apresentaram turvação em TSB, indicando crescimento microbiológico (Tabela 1). Essas amostras foram assepticamente removidas dos seus respectivos béqueres e individualmente colocadas em béqueres contendo 200 mL de solução salina. A seguir, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para obtenção das diluições seriadas e para a realização de semeadura em placas de Petri. Esses procedimentos foram realizados a fim de se verificar se o crescimento microbiológico correspondia ao de *C. albicans*, descartando a hipótese de contaminação das amostras por algum outro microrganismo que não o inoculado experimentalmente. Após incubação das placas a 37°C por 48 horas, foi constatado que o crescimento microbiano correspondia ao microrganismo avaliado (*C. albicans*).

Assim, com base nos resultados obtidos, foi concluído que a imersão em digluconato de clorexidina 2% ou 1% por 10 minutos foi efetiva na desinfecção de próteses totais contaminadas com *C. albicans*.

Referências:

1. ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral candidal infections and antimycotics. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 11, n. 2, p. 172-198, 2000.
2. MCCOURTIE, J.; MACFARLANE, T.W.; SAMARANAYAKE, L.P. Effect of chlorhexidine gluconate on the adherence of Candida species to denture acrylic. **J. Med. Microbiol.**, v. 20, p. 97-104, 1985.
3. BACHETTE, L.G. et al. Efetividade da solução de digluconato de clorexidina na desinfecção de próteses totais contaminadas por *C. albicans*. **Braz. Oral Res.**, v. 19, p.61, 2005.

Bolsa: CNPq - processo: 503467/2004-9