

EFEITO DA IRRADIAÇÃO COM MICROONDAS SOBRE CÉLULAS DE *Candida albicans*. Luciana Fernandes Ballan, Ana Cláudia Pavarina, Nara Hellen Campanha, Carlos Eduardo Vergani, Ana Lúcia Machado, Eunice Teresinha Giampado – Odontologia – Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Campus de Araraquara.

A candidose bucal é uma infecção fúngica associada a espécies de *Candida*, sobretudo a *C. albicans*. Apesar da *C. albicans* ser um microrganismo comumente encontrado na cavidade bucal, em relação de comensalismo, esse tipo de fungo apresenta a habilidade de alterar sua morfologia, levando a uma infecção dos tecidos bucais. Esses microrganismos podem colonizar a cavidade bucal uma vez que apresentam capacidade de aderência às células epiteliais e à resina da base das próteses. A candidose bucal relacionada à utilização de próteses removíveis é classificada como estomatite protética, tendo tratamentos variados como terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal e procedimentos de desinfecção e higienização das próteses.^{1,2,3,4,5,10} Apesar desses medicamentos serem eficazes para aliviar os sinais e sintomas clínicos da estomatite associada à *C. albicans*, muitas vezes não eliminam completamente esse microrganismo^{3,8} e pode ocorrer recorrência de infecção após o término do tratamento. Nesse sentido, torna-se fundamental na fase de tratamento, a utilização de métodos que inativem os microrganismos presentes nas superfícies das próteses.⁷

A irradiação pelo método das microondas tem sido relatada como efetiva na inativação de *C. albicans*^{6,9}. Entretanto, os mecanismos pelos quais a energia de microondas atua sobre os microrganismos ainda não estão completamente esclarecidos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do tempo de irradiação (1 a 5 minutos) com microondas sobre células de *C. albicans*, por meio de parâmetros de contagem celular e de liberação de substâncias intracelulares.

Para o desenvolvimento deste estudo, inicialmente, foram obtidas culturas de *C. albicans* em Tryptic Soy Broth (TSB) a partir de cepas padrão (ATCC 10231). As células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 400 mL de água destilada gelada na concentração de 10^8 cél/mL. Essa suspensão foi dividida em experimental e controle. A suspensão experimental (200 mL) foi colocada em um béquer de 500 mL contendo uma prótese total acrílica estéril e irradiada por microondas durante 1 a 5 min a 650 W. A suspensão controle não foi submetida à irradiação. Para ambas as suspensões, foram realizadas diluições seriadas para contagem celular em câmara de Neubauer, utilizando a entrada do corante azul de Metileno, como indicativo de alteração de permeabilidade de membrana. Alíquotas diluídas também foram semeadas em placas de Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e o número de UFC/mL foi calculado. Alíquotas não diluídas foram analisadas quanto à densidade óptica (DO) a 550 nm. Para a quantificação de substâncias liberadas, as células foram eliminadas das suspensões por centrifugação e filtragem e a solução resultante foi liofilizada. O conteúdo liofilizado foi ressuspense em volumes menores de água destilada (3 mL) e analisado pelos seguintes métodos: Microprote e Sensiprote, para quantificação de proteínas; potenciometria, para quantificação de Na^+ e K^+ ; Liquiform, para quantificação de Ca^{++} ; e DO a 260 nm para quantificação de DNA. Os testes de contagem celular foram realizados em duplicata. Todos os testes de contagem e de liberação de substâncias foram repetidos em 2 dias diferentes.

Neste trabalho avaliaram-se a contagem celular e a quantificação da liberação de substâncias intracelulares em suspensões de culturas submetidas à irradiação por microondas pelos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos e em suspensões tomadas como controle. Ao controle supõe-se corresponder o índice máximo de contagem celular e mínimo de liberação de substâncias. Foram empregados procedimentos gráficos e da análise de regressão linear, ao nível de 5% de significância. O teste *t* de Student foi utilizado para verificar se a *intercepto* ou o *coeficiente de regressão* são diferentes de zero.

No grupo controle, as contagens em câmara de Neubauer e unidades formadoras de colônias (ufc/mL) variam em torno da média, pois não há evidência de regressão linear ($P > 0,05$). Com exceção da contagem de células não íntegras igual a zero, as contagens são significativamente diferentes de zero ($P < 0,001$). Para o grupo experimental, a contagem de

células não integras se manteve próxima da média em todo intervalo de tempo. Nesse mesmo grupo, as contagens de células íntegras apresentaram valores semelhantes ao controle no tempo 1 min e, em tempos superiores a 3 min, as contagens decaem para zero (Figura 1). Para o método de densidade ótica não há um comportamento bem definido dos valores obtidos, tanto no grupo controle como no grupo experimental. As médias dos dois grupos em análise são muito próximas e a variabilidade das médias, medida pelo desvio padrão, é alta (Figura 2).

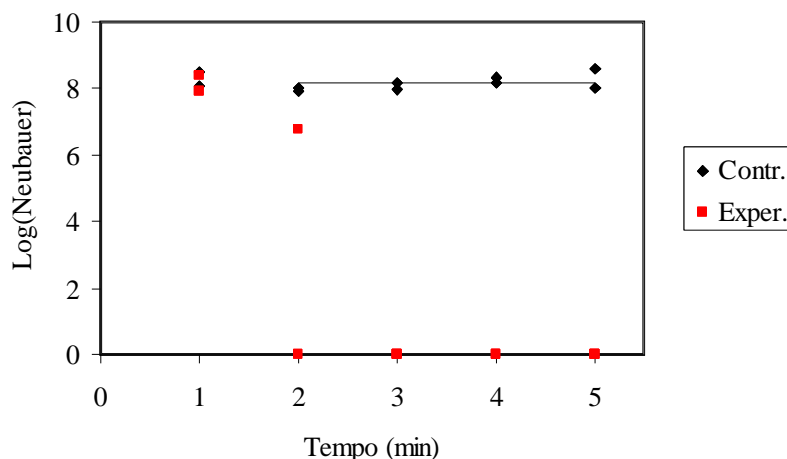


Figura 1 – Logaritmos de contagens de células íntegras obtidas em câmara de Neubauer em suspensões do grupo controle e do grupo experimental (O traço horizontal representa a média)

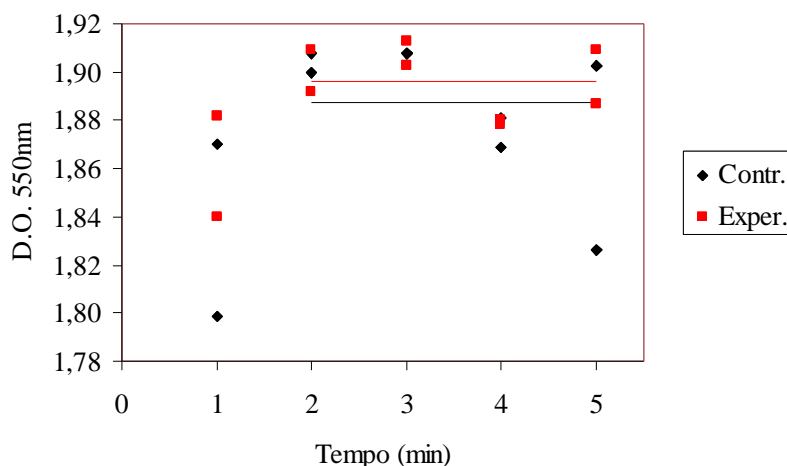


Figura 2 – Contagens de células obtidas pelo método de densidade ótica 550 nm em suspensões do grupo controle e do grupo experimental (Os traços horizontais representam as médias)

Na quantificação de proteínas pelos sistemas Microprote e Sensiprote, não há evidência de regressão linear com o sistema Microprote ($P > 0,05$) e há alguma evidência de regressão linear com o sistema Sensiprote ($P = 0,041$) (figura 3). Entretanto, ela não tem importância se comparada com a variação no grupo experimental. Além disso, as médias são próximas de zero. No tempo de 1 min de irradiação as quantidades de liberação de proteínas no grupo experimental são somente um pouco acima daquelas do controle. Além disso, não há um padrão de comportamento, de modo que a média pode representar os dados, mas o desvio padrão é, portanto, a variabilidade é grande.

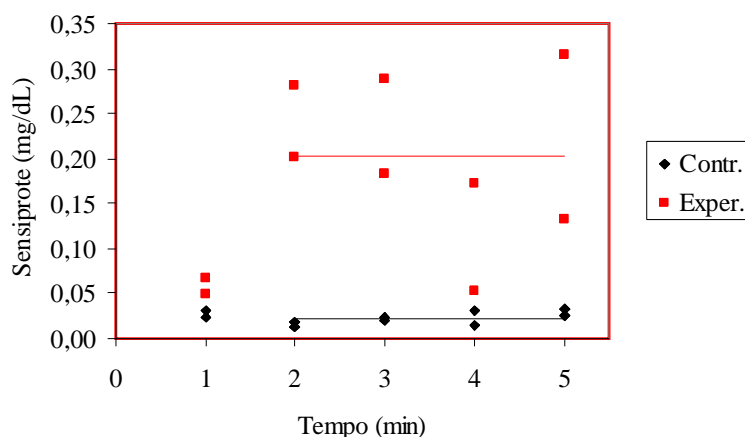


Figura 3 - Quantificação de proteínas pelo sistema Sensiprote em suspensões do grupo controle e do grupo experimental (Os traços horizontais representam as médias)

Em relação à liberação de K^+ , no controle obteve-se em todas as suspensões o valor zero. Para o grupo experimental, no tempo 1 min o resultado é próximo de zero e de 2 min em diante tendem a seguir a média com desvio padrão alto. Quanto à liberação de Ca^{++} , após 1 min, tanto no controle como no grupo experimental, os resultados acompanham a média, também com desvio padrão alto. De qualquer forma, a média do grupo experimental é aproximadamente 2,5 vezes maior do que a média do grupo controle.

Com relação aos valores de liberação de ácidos nucleicos (DNA/RNA), na suspensão controle, os valores se aproximam da média, com exceção dos valores obtidos com 3 min de irradiação, que se apresentam inferiores aos outros valores obtidos. Na suspensão experimental, com 1 min de irradiação os valores de concentração dos ácidos nucleicos são maiores do que os valores obtidos para a suspensão controle. Entre os tempos de 2 a 5 minutos, essa relação se inverte, passando a suspensão controle a apresentar valores inferiores à suspensão experimental. Ainda nesses tempos de exposição, na suspensão experimental, não existe evidência de diferença entre as médias de concentração dos ácidos nucleicos, apresentando-se praticamente iguais entre si, o que denota uma ausência de aumento de liberação com o aumento do tempo de exposição acima de 2 minutos)

Dentro das condições experimentais do presente estudo, pudemos concluir que a irradiação de suspensões de *C. albicans* com microondas:

- Ø causou a inativação celular e promoveu redução no número de células viáveis, por meio da contagem das ufc/mL em meio sólido aos 3 minutos ou mais de irradiação;
- Ø promoveu alteração na permeabilidade de membrana e paredes celulares, causando redução do número de células íntegras na suspensão experimental após 3 minutos de irradiação;
- Ø não promoveu redução no número total de células contáveis (soma de íntegras e não íntegras) em câmara de Neubauer, pelo fato de não terem sofrido lise completa;
- Ø não promoveu redução da densidade óptica a 550 nm nas suspensões irradiadas, pelo fato de não terem sofrido lise completa, quando comparadas com as suspensões controle;
- Ø provocou liberação de proteínas para o meio extracelular em tempos de irradiação iguais ou superiores a 2 minutos, não tendo sido essa liberação aumentada com o aumento do tempo de irradiação;
- Ø provocou liberação de K^+ para o meio extracelular em tempos de irradiação iguais ou superiores a 2 minutos, não tendo sido essa liberação aumentada com o aumento do tempo de irradiação;
- Ø provocou liberação de Ca^{++} para o meio extracelular em tempos de irradiação iguais ou superiores a 2 minutos, não tendo sido essa liberação aumentada com o aumento do tempo de irradiação.

Referências Bibliográficas

1. ABELSON, D.C. Denture plaque and denture cleansers. J. Prosthet. Dent., St. Louis, v. 45, n. 4, p. 376-379, Apr. 1981.
2. ABERE, D.J. et al. A study of materials and methods employed in cleaning dentures. Br. Dent. J., London, v. 124, p. 107-115, 1968.
3. BANTING, D. W., GREENHORN P.A., MCMINN, J.G. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized adults. J. Can. Dent. Assoc., Toronto, v. 61, n. 3, p. 203-5, Mar. 1995.
4. BUDTZ-JORGENSEN, E. Materials and methods for cleaning dentures. J. Prosthet. Dent., St. Louis, v. 42, n. 6, p. 619-623, Dec. 1979.
5. CHAN, E.C. et al. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. J. Calif. Dent. Assoc., Sacramento, p. 937-939, Dec. 1991.
6. DIXON, D. L. BREEDING, L.C., FALER, T.A. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. J. Prosthet. Dent., St. Louis, v. 81, n. 2, p. 207-214, Feb. 1999.
7. HOAD-REDDICK, G., GRANT, A.A., GRIFFITHS, C.S. Investigation into the cleanness of dentures in an elderly population. J. Prosthet. Dent., St. Louis, v. 64, n. 1, p. 48-52, Jul. 1990.
8. KULAK, Y., ARIKAN, A., DELIBALTA, N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. J. Prosthet. Dent., St. Louis, v. 72, n. 3, p. 283-288, Sep. 1994.
9. MIMA, E. G. O., PAVARINA, A.C., SPOLIDORIO, D.M.P., NEPPELENBROEK, K.H., MACHADO, A.L., GIAMPADO, E.T. Efeito do tempo de irradiação sobre a efetividade da desinfecção em microondas de uma resina para reembasamento. Pesquisa Odontológica Brasileira, Araraquara, v. 20, p. 224, Set. 2006.
10. POLYZOIS, G.L. Denture cleansing habits. A survey. Aust. Dent. J., St. Leonards New South Wales, v. 8, n. 3, p. 171-173, Jun. 1983.

Bolsa: CNPq/PIBIC