

EFEITOS DO VINAGRE EM CÉLULAS DE *Candida albicans* ADERIDAS *IN VITRO* EM RESINA ACRÍLICA TERMICAMENTE ATIVADA

Iara Pinheiro Barros Andrade¹, Ivan da Silva Faria², Silvana Soléo Ferreira dos Santos³, Marcos Augusto do Rego⁴, Antonio Olavo Cardoso Jorge⁵

¹UNITAU, Mestre em Odontologia, Subárea Dentística

²UNITAU, Laboratório de Microbiologia

³UNITAU, Curso de Odontologia

⁴UNIVAP e UNITAU, Curso de Odontologia

⁵UNESP, Curso de Odontologia. Rua José Pereira dos Santos, 233 – URBANOVA – São José dos Campos, SP. CEP 12 244 484 marcosreg@uol.com.br

Resumo- O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do vinagre em células de *Candida albicans* aderidas *in vitro*, em resina acrílica utilizada para confecção de prótese total. Foram confeccionados 36 espécimes em resina acrílica termicamente ativada, os quais foram imersos individualmente em cultura de *C. albicans* por 24 h. A seguir, 12 espécimes foram imersos em solução de vinagre a 10%, 12 à solução de vinagre a 30% e 12 foram colocados em solução fisiológica. Os espécimes foram submetidos à desinfecção com vinagre por 30 e 60 min. A seguir, foram quantificados os log de UFC/mL de microrganismos aderidos aos espécimes. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, teste de Tuckey ($p=0,05$). Os resultados demonstraram redução significativa no log de UFC/mL de *C. albicans* nos espécimes submetidos ao tratamento com solução de vinagre a 10 e 30% em relação ao grupo controle, sendo a solução a 30% mais efetiva. Não ocorreu diferença significativa quando da utilização do vinagre, nos tempos de 30 e 60 min, para as duas concentrações do produto (10 e 30%).

Palavras-chave: *Candida*, *Candida albicans*, prótese total.

Área de Conhecimento: Odontologia

Introdução

Doenças fúngicas, têm preocupado cada vez mais os cirurgiões dentistas, não só quanto ao seu diagnóstico, mas também com relação ao tratamento e prevenção. Neste aspecto, cabe ressaltar o papel dos fungos do gênero *Candida*. Entre as espécies, a mais importante pela sua frequência e patogenicidade é *Candida albicans*. Na cavidade bucal humana, o gênero está presente entre 35 a 60% da população (PARDI; CARDOZO, 2003).

Alterações sistêmicas e locais são consideradas como fatores predisponentes às candidoses bucais. Fatores gerais como: idade, imunossupressão, discrasias sanguíneas, e, fatores locais como xerostomia, traumatismos, em especial os causados por próteses mal-adaptadas, principalmente as que recobrem extensas áreas da mucosa bucal, como as prótese totais, predispõem o aumento de *Candida* na cavidade bucal. A ação mecânica efetuada pela prótese total nos tecidos, assim como a oclusão de ductos das glândulas salivares menores, são os fatores mais importantes relacionado à formação de lesões na mucosa bucal, principalmente nas áreas recobertas pela base da prótese (JORGE et al., 1997).

As resinas acrílicas utilizadas para confecção de próteses totais também são fatores que podem predispor à colonização de leveduras, principalmente do gênero *Candida* (OLSEN, 1974). Saramanayake; MacFarlane (1980) estudaram *in vitro* a aderência de *Candida albicans* às superfícies acrílicas e notaram correlação positiva e significativa entre a concentração do fungo na suspensão e sua adesão ao acrílico.

O tratamento específico das candidoses bucais quando de caráter local, é realizado por enxágüe da boca com anti-sépticos. A colocação das próteses em recipientes com soluções antimicrobianas têm demonstrado resultados satisfatórios (BIRMAN, 1998). No entanto, acreditamos que novas formulações e novas substâncias possam ser usadas no controle de *C. albicans* da superfície interna das próteses totais, já que a levedura está presente em maior quantidade na resina da prótese que na mucosa correspondente (PARDI; CARDOZO, 2003).

O presente estudo objetivou verificar os efeitos do vinagre na concentração de 10% e 30%, em células de *C. albicans* aderidas *in vitro* em resina acrílica termicamente ativada, utilizada como base para confecção de próteses totais.

Material e Métodos

Foram confeccionados 36 corpos-de-prova em resina acrílica termicamente ativada (Biotene), cor 66, utilizada para confecção de próteses totais, com 7 mm de altura e 7 mm de diâmetro em forma de hexágono. Após prensagem em mufla, para polimerização a 72°C, durante 12 h, os espécimes foram removidos, lavados em água corrente e receberam acabamento com auxílio de ponta *maxi-cut* (Odonto Mega) e broca carbide (nº 703). A seguir, os espécimes foram padronizados em 7 mm de diâmetro, com paquímetro, e foram cortados com discos de carborundum (Dentorium).

Após acabamento, os espécimes foram polidos em torno (Knebel), utilizando rodas de pano e pedra-pomes (Uraby), seguida de branco de Espanha (Uraby). A seguir, os espécimes receberam duas camadas de esmalte para unhas (Colorama), com exceção de uma das superfícies basais e foram autoclavados a 123°C/ 15 min.

Para aderência, foi utilizada cepa padrão de *Candida albicans* (F 72) proveniente do laboratório de Microbiologia da Universidade de Taubaté. A cepa foi previamente semeada em agar Sabouraud Dextrose (Difco) e foi incubada a 37°C/24 h para sua ativação. A seguir, uma colônia isolada da levedura foi semeada em caldo Sabouraud dextrose (Difco) e foi incubada a 37°C/18 h. A seguir, 1,5 mL da cultura de *C. albicans* foi adicionada em 6 poços da primeira fileira (A) de uma placa para cultura de células (Costar). A seguir, os espécimes foram mergulhados em cada poço A, com a superfície sem esmalte para cima e a placa foi incubada a 37°C/48 h, para ocorrer a aderência do microrganismo.

Os espécimes foram divididos em 6 grupos contendo 6 espécimes cada. Cada grupo foi colocado em uma placa para cultura de células e foram submetidos aos tratamentos indicados no Quadro 1. Todos os procedimentos a seguir foram realizados com assepsia em capela de fluxo laminar (Veco).

Após a prévia aderência de *C. albicans* aos espécimes, as placas para cultura de células foram removidas da estufa e levadas ao fluxo laminar para adição de 1,5 mL de solução salina esterilizada nas suas segundas e terceiras fileiras, denominadas de poços B e C respectivamente e solução de vinagre nas suas quartas fileiras, denominadas de poços D. Com auxílio de uma pinça esterilizada, os espécimes foram retirados dos poços A e mergulhados respectivamente, por 1 min, nos poços B e C. A seguir, foram mergulhados na solução de vinagre

(Fermentado acético de álcool e vinho branco, acidez 4,0%, Castello Alimentos, Jundiaí, SP) diluídas em 10 e 30%, na qual permaneceram por 30 ou 60 min, conforme o grupo. Decorridos o tempo de desinfecção, os espécimes foram retirados da solução de vinagre e foram colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada e pérolas de vidro e agitados em vibrador (Vortex) por 1 min. A partir da solução obtida, foram realizadas diluições decimais, as quais foram semeadas em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco) e foram incubadas a 37°C/48 h. Após crescimento, as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram quantificadas nas placas que continham de 30 a 300 colônias e os números obtidos foram convertidos para seu logaritmo correspondente (log UFC/mL).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de Variância ANOVA, teste de Tukey, considerando-se diferença estatística quando $p \leq 0,05$.

Quadro 1 – Tratamento para avaliar os efeitos de soluções de vinagre a 10 e 30% sobre *Candida albicans* aderida em corpos-de-prova (resina acrílica termicamente ativada)

Grupos	Imersão	Tempo (min)	n
Vin 10% 30min	Vin 10 %	30	6
Vin 10% 1 h	Vin 10%	60	6
Vin 30% 30 min	Vin 30%	30	6
Vin 30% 1 h	Vin 30%	60	6
Controle 30 min	NaCl 0,9%	30	6
Controle 1 h	NaCl 0,9%	60	6

Vin: vinagre

Resultados

Na tabela 1, estão expressas as médias e desvio-padrão do log de UFC/mL de *C. albicans* nos controles e após os espécimes receberem tratamento com solução de vinagre. Observou-se redução no número de UFC/mL após tratamento com vinagre a 10% e redução maior no tratamento com vinagre a 30%.

Na tabela 2, observa-se as comparações estatísticas, utilizando-se Análise de Variância ($p \leq 0,05$). Pode-se observar que ocorreu diferença estatística entre os grupos em relação às condições de desinfecção. Não ocorreu diferença entre os tempos de imersão de 30 e 60 min nas soluções de vinagre.

Na tabela 3, pode-se observar as comparações estatísticas, por meio do teste de Tukey, entre os grupos vinagre 10%, vinagre 30% e controle. Observa-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 1 – Médias e desvio-padrão do logUFC/mL de *C. albicans* recuperadas após aderência (controle) em resina acrílica termicamente ativada e após serem submetidas à solução de vinagre a 10 e 30% durante 30 e 60 min

TRATAMENTO	TEMPO min	MÉDIA logUFC/mL	DP logUFC/mL
Controle	30	7,003	0,175
Vin 10%	30	5,665	0,103
Vin 30%	30	4,524	0,524
Controle	60	6,883	0,108
Vin 10%	60	5,645	0,174
Vin 30%	60	4,001	0,205

Vin: vinagre

Tabela 2 – Análise de variância dos dados das unidades formadoras de colônias (Log UFUC/ml) de *Candida albicans* obtidos nos seguintes grupos experimentais: vinagre 10%, vinagre 30% e controle

Fonte de Variação	Graus Liberdade	Soma Quadras	Quadra -do Médio	Razão F	p
1	2	49,42	24,71	370,6	0,01*
2	1	0,07	0,07	1,11	0,301
1 X 2	2	0,03	0,19	0,29	0,752
Resíduo	30	2,00	0,66		
Total	35	51,53			

1: Condições de desinfecção: Vinagre 10%, vinagre 30% e controle; 2: Tempos de desinfecção

* diferença estatisticamente significante

Tabela 3 – Teste de Tukey para os dados de Log UFUC/ml) de *C. albicans* obtidos nas diferentes condições de desinfecção com vinagre 10%, vinagre 30% e controle (solução fisiológica)

Grupos	Controle	Vin 10%	Vin 30%
Controle	-	p = 0,001	p = 0,001
Vin 10%	p = 0,001	-	p = 0,001
Vin30%	p = 0,001	p = 0,001	-

Vin: Vinagre

Discussão

Optou-se pela utilização do vinagre no presente estudo, por tratar-se de um produto comumente encontrado no comércio, podendo ser facilmente adquirido. O vinagre apresenta também preço acessível, podendo ser utilizado por indivíduos de renda familiar menor. Avaliando-se os resultados encontrados no presente estudo, pode-se inferir que a retirada da prótese no período noturno e sua imersão pelo tempo mínimo de 30 min em solução a 30% de vinagre, poderá trazer melhora no quadro clínico da estomatite por prótese.

A escolha da espécie *C. albicans* para os ensaios *in vitro* realizados foi baseado na sua maior frequência na cavidade bucal de pacientes saudáveis assim como sua maior frequência de isolamento de candidoses bucais. Além disso,

constitui-se a espécie mais patogênica do grupo (JORGE et al., 1987; JEGANATHAN; LIN, 1992; JORGE et al., 1997; NIKAWA et al., 2003; PARDI; CARDOZO, 2003)

Colônias de *C. albicans* podem ser isoladas mais frequentemente da superfície interna das próteses totais do que da mucosa correspondente, sendo que o tratamento deve, portanto ser direcionado primeiramente à prótese. A estomatite por prótese, não é uma patologia que leva a sérios danos aos indivíduos, entretanto é importante prevenir esta alteração, uma vez que uma mucosa inflamada representa um suporte deficiente para a prótese e também pode, possivelmente, contribuir para a reabsorção óssea subjacente (BUDTZ-JORGENSEN, 1990).

A solução a ser utilizada para a desinfecção das próteses dentárias tem fundamental importância, não apenas em relação a sua capacidade antimicrobiana, biocompatibilidade, mas também econômica, o que levou a utilização do vinagre no presente trabalho.

Segundo Birman (1998), a aplicação de anti-sépticos pode ser altamente desejável. Bergendal (1982) relatou que antifúngicos não são produtos de escolha para o tratamento da estomatite protética. O tratamento tópico com antifúngicos apresenta efeito temporário, porque os sítios bucais tendem a ser re-infectados com *C. albicans*.

Glass (1992) utilizou solução de vinagre a 50% para imersão de aparelhos acrílicos removíveis, pelo período de 1 h, e conseguiu redução na contaminação contida nos mesmos. Chibebe Junior (2003) utilizou solução de vinagre em várias diluições, para borrifar cerdas de escovas dentais previamente contaminadas com *Streptococcus pyogenes* e obteve a eliminação do microrganismo destas. Desta forma, acreditamos que a utilização do vinagre para desinfecção de próteses totais poderá trazer benefícios para a saúde dos pacientes. O vinagre representa um produto de fácil acesso no mercado brasileiro, como também de fácil utilização. Tem sido utilizado domiciliarmente para descontaminação de verduras e legumes antes do consumo.

Tendo em vista a metodologia utilizada no presente estudo, realizado *in vitro*, observou-se que *C. albicans* foi capaz de aderir na resina acrílica, e a solução de vinagre foi efetiva na eliminação deste patógeno da resina, tanto no tempo de 30 como de 60 min. Desta forma, a utilização do vinagre para desinfecção de próteses totais pareceu-nos um método viável de ser utilizado, tanto nos portadores de prótese sem estomatite protética de forma preventiva, como nos portadores de prótese com a doença,

proporcionando possível melhora do quadro inflamatório.

Conclusões

Os resultados encontrados no presente trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

- Ocorreu redução estatisticamente significativa no log UFC/mL de *C. albicans*, em espécimes confeccionados com resina acrílica termicamente ativada, submetidos a tratamento com solução de vinagre a 10 e 30% em relação ao controle.
- O tratamento com solução de vinagre 30% mostrou-se mais efetivo na redução da aderência de *Candida albicans*.
- Não ocorreu diferença significativa quando da utilização do vinagre, nos tempos de 30 e 60 min, para as duas concentrações do produto (10 e 30%)

Referências

BERGENDAL, T. Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. **Scand J Dent Res**, v.90, n.3, p. 227-38, 1982.

BIRMAN, E. G. Um breve retrospectivo sobre *Candida* e candidoses em relação à boca. **Rev Racine**, v.3, n.42, p.56-9, 1998.

BUDZT-JORGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeas infections. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.61-9, 1990.

CHIBEBE JUNIOR, J. Contaminação de escovas dentais por *Streptococcus pyogenes* e sua desinfecção. 2003. 42f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)- Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2003.

GLASS, R. T. The infected toothbrush, the infected denture, and transmission of disease: a review. **Compendium**, v.13, n.7. p.592-8, 1992

JEGANATHAN, S.; LIN, C.C. Denture stomatitis: a review of the aetiology, diagnosis and management. **Aust Dent J**, v.37, n.2, p.107-14, 1992.

JORGE, A.O.C.; et al. Influência do uso de aparelhos ortodônticos sobre a presença de *Candida albicans* na cavidade bucal. **Rev APCD**, v.41, n.1, p.308-10, 1987.

JORGE, A.O.C.; et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.11, n.4, p. 279-85, 1997.

NIKAWA, H.; et al. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers *in vitro*. **J Oral Rehabil**, v.30, n.03, p.243-50, 2003.

OLSEN, I. Denture stomatitis: Occurrence and distribution of fungi. **Acta Odontol Scand**, v.32, n.5, p.329-33, 1974.

PARDI, G.; CARDOZO, E.I. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. **Acta Odontol Venez**, v.40, n.3, p. 41-6, 2003.

SAMARANAYAKE, L.P., Mac FARLANE, T.W. An *in-vitro* study of the adherence of *C. albicans* to acrylic surfaces. **Arch Oral Biol**, v.25, n.8-9, p.603-9,1980. SHEPHERD, M.G. The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidosis. **N Z Dent J**, v. 82, n.369, p.78-81, 1986.