

KARINA SEVERO PUPIN

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA
DESINFECÇÃO DE CHUPETAS: UM ESTUDO *IN VITRO***

CAMPO GRANDE
2019

KARINA SEVERO PUPIN

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA
DESINFECÇÃO DE CHUPETAS: UM ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Clínica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariane Emi Sanabe

CAMPO GRANDE
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karina Severo Pupin

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA
DESINFECÇÃO DE CHUPETAS: UM ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariane Emi Sanabe

Resultado_____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mariane Emi Sanabe
Instituição: UFMS

Prof^a. Dr^a. Andrea Freire de Vasconcelos Eckelberg
Instituição: UFMS

Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Silva Marques
Instituição: UFMS

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda benção, luz e força enviada sobre mim e por estar sempre ao meu lado, guiando e trilhando meus caminhos. Agradeço a Deus também por me enviar pessoas boas e comprometidas a me ajudar na realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por me proporcionar uma ótima formação e me subsidiar todos os recursos necessários para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Mariane Emi Sanabe, minha orientadora, por toda confiança, amizade, orientação, dedicação, paciência, coragem, incentivo, afeto e compreensão em todos os momentos em que precisei. Quando tudo parecia perdido e sem saída, a senhora entrou em meu caminho, mostrando uma nova visão para as coisas e fazendo com que esse sonho virasse realidade. À senhora, meu sincero e carinhoso agradecimento.

À Prof^a Dr^a. Sonia Maria Fernandes Fitts e à Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Silva Marques, pela paciência, disponibilidade, orientação, dedicação, incentivo, compreensão. As senhoras foram partes fundamentais nesse trabalho, me orientando, aconselhando e instruindo sempre pelo melhor caminho.

Aos técnicos de laboratório Ronie Benites de Abreu e Ana Paula de Oliveira Ricaldi de Castilho por todo ensinamento, paciência, dedicação, confiança, auxílio e amizade. Sem vocês esse trabalho não seria possível, vocês me ensinaram muito e sempre estavam dispostos a me ajudar. À vocês, meus sinceros agradecimentos e gratidão.

À equipe de técnicos do laboratório de Microbiologia, Marcelo e Helenice, por toda paciência e auxílio no laboratório.

À aluna de graduação Nayara Minami, pelo apoio e auxílio na realização da pesquisa.

Ao meu marido Anderson e à minha pequena filha Lívia, por toda compreensão, carinho, amor, paciência, incentivo, coragem e força. Vocês sempre foram meu porto

seguro, estando ao meu lado em todos os momentos, me dando forças para seguir em frente, me apoiando nas minhas decisões e principalmente, compreendendo todos os finais de semana que abdiquei de estar com minha família para a realização de mais esse sonho. À vocês todo meu amor, carinho e gratidão. Amo vocês.

A minha família, pai, mãe e irmã, pela compreensão, incentivo, esforço e apoio. Sem vocês ao meu lado nada seria possível.

RESUMO

Pupin KS. **Avaliação da eficiência de métodos práticos para desinfecção de chupetas: um estudo *in vitro***. Campo Grande; 2019. [Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O hábito de sucção da chupeta é utilizado para acalmar a criança, reduzir o choro e melhorar o sono. Entretanto, como qualquer outro levado a boca, a chupeta apresenta-se como um potencial reservatório de microrganismos, podendo ser colonizada por diferentes microrganismos e servir como fonte de transmissão de infecções na ausência de uma correta higienização. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, diferentes soluções para desinfecção de chupetas, após contaminação em laboratório por três diferentes microrganismos. Para a realização da pesquisa foram utilizados 180 bicos de chupetas, divididos em seis grupos e cinco deles contaminados por três microrganismos diferentes: *Candida albicans* (CA) (n=30), *Staphylococcus aureus* (SA) (n=30) e *Escherichia coli* (EC) (n=30). Após a contaminação, cada grupo contendo 30 bicos de chupeta, foi exposto a um agente desinfetante: CLX- clorexidina 0,12%, SHB- spray higiênico bucal infantil, EAP- extrato aquoso de própolis e AMD- água mineral e detergente, com exceção dos grupos controle positivo e negativo. Após a desinfecção, os bicos foram cortados e colocados em solução salina estéril que, posteriormente, foi diluída e plaqueada em meio BHI ágar para que fossem contadas as unidades formadoras de colônia (UFC), em triplicata, avaliando a eficiência de cada agente desinfetante. Os dados foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis e pós teste de Bonferroni. Os resultados demonstraram a redução estatisticamente significativa de UFC para todos os microrganismos e soluções testadas ($p < 0,0001$), sendo o spray higiênico bucal o mais efetivo, seguido da lavagem com água mineral e detergente, clorexidina e extrato de própolis. Concluiu-se que todas as soluções avaliadas tiveram efeitos satisfatório na desinfecção de chupetas contaminadas por bactérias e fungo.

Palavras-chave: chupetas, contaminação, desinfecção.

ABSTRACT

Pupin KS. Campo Grande; 2019. **Assesment of pratical methods for pacifiers disinfection – in vitro study** [Master Degree – Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry Prof. Albino Coimbra Filho, Mato Grosso do Sul Federal University].

The aim of this study was to evaluate the microbial contamination of pacifiers in vitro and the efficacy of four diferents disinfection solutions (0,12% chlorexidine, hygienic bucal spray, própolis extract and mineral water plus detergent). The pacifiers were contaminated with *Candida albicans* (n= 60), *Staphylococcus aureus* (n=60) and *Escherichia coli* (n=60). After contamination, the pacifiers were disinfected with solutions, the silicone área were cutted and putted in saline solution and after inoculated in BHI. Data obtained for microorganisms counts were expressed as colony-forming units per millilitre (CFU/mL) and analysed for Kruskal Wallis and post - test Bonferroni. All tested solutions were able to significantly reduce contaminated pacifiers, however, the most effective reduction in *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were observed after treatment with hygienic bucal spray in comparison to the others solutions mineral water plus detergente, 0,12% chlorexidine and propolis extract. The all solutions were effective of pacifiers disinfection.

Keywords: pacifiers, contamination, disinfection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Soluções utilizadas na desinfecção.

Figura 2 – Divisão dos Grupos.

Figura 3 – Colônias isoladas.

Figura 4 – Contaminação das chupetas.

Figura 5 – Borrifadas das soluções desinfetantes.

Figura 6 – Método de plaqueamento por gotas.

Figura 7 – Gráfico *Boxplot* da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Candida albicans*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Figura 8 – Gráfico *Boxplot* da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Staphylococcus aureus*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Figura 9 – Gráfico *Boxplot* da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Escherichia coli*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição das soluções utilizadas para a desinfecção.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise comparativa da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Candida albicans*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Tabela 2 – Análise comparativa da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Staphylococcus aureus*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Tabela 3 – Análise comparativa da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Escherichia coli*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Tabela 4 – Análise comparativa da porcentagem de redução de microrganismos de cada solução desinfetante.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Pediatria
AMD	Água Mineral e Detergente
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart <i>Infusion</i>
CA	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
CLX	Clorexidina 0,12%
cm	Centímetro
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
EAP	Extrato Aquoso de Própolis
EC	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
g	Gramma
h	Horas
InBio	Instituto de Biociências
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SHB	Spray Higiênico Bucal Infantil
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SMSI	Síndrome da Morte Súbita Infantil
TTO	<i>Tea Tree Oil</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Uso da chupeta.....	15
2.1.1 Prevalência do uso da chupeta.....	15
2.1.2 Benefícios da chupeta e seu uso em hospitais e UTIs.....	16
2.1.3 Malefícios da chupeta.....	18
2.2 Contaminação em crianças por microrganismos patogênicos.....	19
2.3 Contaminação em chupetas e os métodos de desinfecção.....	20
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivo específico.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	25
4.1 Chupetas.....	25
4.2 Microrganismos.....	27
4.2.1 Cultura estoque.....	27
4.2.2 Preparo das culturas.....	28
4.2.3. Preparo do inóculo.....	28
4.2.4 Contaminação das chupetas.....	29
4.2.5 Descontaminação das chupetas.....	30
4.2.6 Contagem dos microrganismos.....	31
4.3 Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÕES.....	42
8 REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O uso de chupeta é cada vez mais difundido entre as diferentes culturas modernas, sendo recomendado com o objetivo de acalmar a criança, reduzir o choro, melhorar o sono, ter efeitos analgésicos, suprir parcialmente a necessidade de sucção, e reduzir o risco de morte súbita nos primeiros 6 meses de vida (SEXTON; NATALE, 2009), porém esse hábito de sucção não-nutritiva tem sido associado a efeitos negativos na saúde das crianças, como predisposição a má oclusões dentárias e otite média, a longo prazo (GEDERI et al., 2013).

Um dos fatores benéficos associados ao uso da chupeta se deve a prevenção da Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI) (MCGARVEY et al., 2003). Segundo a Academia Americana de Pediatria (AAP), aproximadamente 3500 crianças morrem anualmente nos Estados Unidos em decorrência da SMSI. A chupeta, quando utilizada particularmente no momento do último período do sono, apresenta um efeito protetor em relação à incidência dessa Síndrome, diminuindo o risco em torno de 50% a 90%. A AAP também relata não haver relação adversa entre uso de chupeta e amamentação parcial ou exclusiva, e alerta para colonização em chupetas e infecções em crianças por espécies de *Candidas*, sendo mais comumente encontrada em usuários de chupetas do que em não usuários (MOON; FAAP, 2016).

O uso da chupeta também está relacionado com a colonização e infecção por microrganismos, por estarem em contato direto com o meio ambiente e, por muitas vezes, não receberem o cuidado adequado (ABREU et al., 2016), sendo os principais microrganismos infectantes os fungos, como a *Candida albicans*, e bactérias, como as enterobactérias (CASTILHO; ROCHA, 2009). Como qualquer outro objeto levado a boca, a chupeta apresenta-se como um potencial reservatório de microrganismos, sendo capaz de levar ao aparecimento de infecções. Deste modo, a chupeta pode ser um veículo de transmissão de doenças como diarreias, viroses, rotavírus, hepatites, otites, candidíase oral, cáries dentárias, gastroenterites, *Stafilococcus*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermiculares*, *Trichuris trichiura*, *Taenia sp.*, larvas de *Ancylostomidae*, entre outros (CASTILHO; ROCHA, 2009).

Na vida cotidiana, as chupetas nem sempre são submetidas a métodos de desinfecção após o uso, sendo somente lavadas em água corrente e secas (NELSON-

FILHO et al., 2015). Independente do material utilizado na confecção dos bicos de chupetas, seja de silicone ou látex, quando em permanente contato com a saliva e com a microflora oral, constituem um poderoso sítio para o crescimento de microrganismos (COMINA et al., 2006).

Os métodos de higiene das chupetas devem ser considerados, pois há um grande desconhecimento sobre a higienização, e uma escassa abordagem sobre o tema, pelos profissionais da saúde, com as famílias e os cuidadores das crianças (SILVA, 1997).

A limpeza é a etapa mais importante do processo de higienização. Consiste em retirar a sujeira de uma superfície e deve ser feita sempre esfregando bem com água e sabão ou detergente, com posterior enxágue e secagem (NELSON-FILHO et al., 2015). Diante disso, a higienização mecânica dos bicos de chupeta com água e sabão torna-se um método rápido, de baixo custo e acessível na rotina dos pais ou cuidadores.

Apesar de existir inúmeros métodos de desinfecção de chupetas, a clorexidina é considerada como padrão ouro (AYEGIIL et al., 2007). O Digluconato de Clorexidina 0,2% ou 0,12% é um agente antimicrobiano de amplo espectro, porém essa solução apresenta efeito residual desagradável na cavidade oral (PEGORARO et al., 2014).

Com o desenvolvimento da resistência aos agentes desinfetantes aumentou-se a necessidade de medidas alternativas que podem ser usadas como forma terapêutica, com isso, o uso de extratos vegetais e compostos fitoquímicos vem ganhando força na sociedade (CHOUHAN et al., 2017). As substâncias naturais têm demonstrado ação antibacteriana, principalmente pelo fato de que grande parte dos vegetais utilizados na medicina alternativa é constituída por flavanóides, que agem sobre as células bacterianas rompendo a membrana citoplasmática e inibindo a atividade enzimática (NASCIMENTO et al., 2000). Dentre essas substâncias, a própolis, produzida pelas abelhas, é um poderoso agente antimicrobiano e anti-inflamatório, apresentando também atividade antiviral *in vitro*, ação anti-úlceras (auxílio na cicatrização) e imunoestimuladora (LONGHINI et al., 2007).

Outro método encontrado hoje no mercado são os sprays higiênicos utilizados para higiene bucal infantil, higiene de chupetas e bicos de mamadeiras. Segundo o

fabricante, são indicados para crianças de 0 a 6 anos e a fórmula desses sprays contém óleos essenciais com propriedades antibacteriana, antifúngica e antiviral, prevenindo infecções que possam surgir na cavidade bucal do bebê, além de ação analgésica, combater o desconforto, acelerar a cicatrização de lesões já instaladas como estomatite e monilíase (sapinho). Devido à ausência de flúor e de álcool, e se caso for ingerido, não apresenta risco de intoxicação, entretanto, para este produto não há nenhum estudo científico publicado. No rótulo do produto encontra-se sua composição, na qual, um dos principais ativos está o óleo essencial de melaleuca (www.inphloral.com.br).

A Melaleuca também é uma substância fitoterápica que vem se destacando na saúde. Conhecida como Melaleuca alternifolia, é uma planta nativa da Austrália, da família *Myrtaceae*, conhecida por tea tree oil – TTO, e a sua forma de uso é o óleo essencial que é obtido por destilação a vapor das folhas. Possui excelentes propriedades medicinais com ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória (KWIECINSKI et al., 2009).

Portanto, buscou-se avaliar diferentes soluções para desinfecção de chupetas, frente à contaminação em laboratório por diferentes microrganismos e, diante disso, detectar a relevância clínica desses métodos, sua eficiência e praticidade na rotina diária de higienização de bicos de chupetas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Uso da Chupeta

2.1.1 – Prevalência do uso de chupetas

Tomasi et al. (1994) realizaram um estudo transversal com mães de 354 crianças menores de dois anos residentes em duas vilas da periferia urbana de Pelotas, RS, com o objetivo de conhecer os padrões de uso da chupeta e seus determinantes. Os autores encontraram que 84% das crianças já haviam utilizado chupeta. A grande maioria das mães (80%) ofereceu chupeta para a criança ainda no hospital, por ocasião do nascimento. Para 62% das crianças o hábito iniciou já no primeiro dia de vida e, aos quinze dias de idade, 80% já o haviam adotado. Os principais motivos alegados pelas mães para oferecer a chupeta as crianças foram “para acalmar ou por causa do choro” e “porque é um costume”. Relataram também que o uso de chupetas foi mais frequente entre crianças mais jovens, entre os filhos de mães com menos escolaridade e entre crianças não amamentadas.

Nunes et al., em 2012, realizaram um estudo descritivo-exploratório, transversal, de abordagem quantitativa, utilizando dados secundários da II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno do ano de 2009, em uma amostra de 3120 crianças, com o objetivo de avaliar a prevalência do uso de bicos artificiais em menores de um ano. Os autores observaram que destas crianças, 41,9% usavam chupeta e 60,7% utilizaram mamadeira e concluíram que introdução do chupeta às vezes pode estar camuflando a ansiedade e a insegurança da mãe frente ao processo alimentar da criança.

Buccini et al. (2014), realizaram um estudo transversal com dados de 34.366 crianças obtidos da II Pesquisa Nacional de Prevalência de Aleitamento Materno, realizada no Brasil em 2008, com o objetivo de analisar os fatores associados ao uso de chupeta e/ou mamadeira em lactentes menores de um ano. Os autores encontraram predomínio de uso exclusivo da chupeta entre as primíparas, os nascidos

de parto cesáreo, os nascidos com baixo peso e meninos. Houve uma maior tendência entre as mães que trabalhavam fora do lar. Ter ingerido chá no primeiro dia em casa e não ter sido amamentado na primeira hora associou-se ao aumento no uso exclusivo de chupeta. Pode-se observar também que mulheres mais jovens ofereceram mais bicos artificiais aos filhos do que aquelas com idade intermediária ou avançada.

Carrascoza et al., em 2014, realizaram um estudo descritivo, exploratório, longitudinal, quantitativo, por meio do acompanhamento de 120 díades mãe-crianças, assistidas por um programa interdisciplinar de incentivo ao aleitamento materno, com o objetivo de avaliar os possíveis determinantes para a introdução de chupeta em crianças durante os primeiros seis meses de vida. Quanto à presença de chupeta, verificou-se que 13,33% das crianças usavam chupeta ao final do primeiro mês de vida e que 23,33% apresentavam este hábito ao término do sexto mês. Entre as crianças que faziam uso de chupeta aos seis meses de vida, foi possível identificar que 57,14% delas iniciaram o uso ainda durante o primeiro mês de vida. O choro da criança foi a justificativa referida por 89,28% das mães para o oferecimento da chupeta aos filhos. O uso de chupeta esteve associado positivamente à ausência de aleitamento materno exclusivo ao final do primeiro mês; e ao final do sexto mês, mostrou-se associado à ausência de aleitamento materno exclusivo no momento da alta hospitalar e ausência de aleitamento materno exclusivo aos seis meses de vida.

2.1.2 – Benefícios da chupeta e seu uso em hospitais e UTIs

Dentre os potenciais benéficos da sucção de chupeta encontra-se o alívio da dor durante procedimentos menores, como cateterismo, circuncisão, imunização, punção lombar e punção venosa; redução da incidência de SMSI e redução da probabilidade do hábito de sucção digital (GEDERI et al., 2013).

Na unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN), os neonatos são submetidos a estímulos dolorosos decorrentes de inúmeros procedimentos invasivos, tanto diagnósticos, quanto interventivos (OLIVEIRA et al., 2011). Como forma de tratamento ou alívio da dor, as terapias não farmacológicas como a sucção não nutritiva, através do uso de chupetas, aplicada dois minutos antes e durante os procedimentos

dolorosos. Sugere-se que o mecanismo de ação dessa terapia seja a dominação sensorial, já que a sucção é uma poderosa fonte de informação para as crianças, pois focaliza sua atenção na atividade de sucção (ÁLVAREZ, 2000).

Dentre outros potenciais benéficos da sucção de chupeta encontra-se o alívio da dor durante procedimentos menores, como cateterismo, circuncisão, imunização, punções (SEXTON; NATALE, 2009; STEVENS et al., 2016), exame oftalmológico para detecção de retinopatias (KANDASAMY et al., 2011), injeções intramusculares (STEVENS et al., 2016), vacinação (GRAY et al., 2015), inserção de tubo de alimentação (KRISTOFFERSEN et al., 2011) e anestésias (HARDCASTLE, 2010).

Considera-se o uso de chupeta como uma prática que pode ser benéfica em UTIs para a habilidade motora oral e confortar o bebê prematuro ou doente, além de ter um papel distintivo de desenvolvimento em duas partes: primeiro, apoia a criança imatura no desenvolvimento de uma sucção madura e bem regulada; segundo, contribui para a alimentação oral, apoiando a estabilidade fisiológica e vários outros benefícios associados a sistemas comportamentais, motores e neurológicos. A chupeta também apresenta benefícios comportamentais melhorando a autoconsolação e efeito calmante. Benefícios ao sistema motor, contribuindo para a melhora do tônus muscular e da coordenação. Benefícios neurológicos devido a maturação acelerada e o melhor manejo da dor. Diminuição no risco da SMSI, através do uso de chupetas em bebês mais velhos, em horários de sesta e de dormir à noite, no entanto, essa redução foi encontrada em combinação com outros fatores, como mães mais velhas, casadas, não fumantes e amamentando, e mães que receberam cuidados pré-natais adequados (LUBBE; HAM-BALOYI, 2017).

A prática de uso da chupeta em UTIs também pode ser indicada para maturação do sistema sensório-motor-oral em neonatos prematuros que permanecem em ambiente hospitalar. As técnicas mais utilizadas são a de sucção não nutritiva com o dedo mínimo enluvado e a da sucção não nutritiva com chupeta. Ambas as técnicas se mostram eficazes no processo de maturação do sistema sensório-motor-oral, refletindo positivamente no desenvolvimento das funções orais dos neonatos, e antecipando a alta hospitalar dos recém-nascidos pré-termo (LEMES et al., 2015).

Say et al., em 2018, realizaram um estudo prospectivo, randomizado e controlado com 90 lactentes divididos em dois grupos: grupo controle e grupo que

fazia uso de chupeta. Os lactentes incluídos no estudo foram os que apresentaram peso corporal menor ou igual a 1500 g, idade gestacional inferior a 32 semanas, tolerância de pelo menos 100 kcal/kg/dia de dieta oral-gástrica, parâmetros de crescimento adequados para a idade gestacional e condição clínica estável. Os autores encontraram que o tempo para a transição para a alimentação oral completa (38 a 19,2 dias), o tempo para a transição para a amamentação completa (38,1 a 20 dias) e o tempo para alta (48,4 a 19,2 dias), no grupo que fazia uso de chupeta, foram significativamente menores, em comparação com o grupo controle. Para os prematuros com distúrbios gastrointestinais, como regurgitação, vômitos e distensão abdominal, os índices encontrados no grupo dos que usavam chupeta foram significativamente menores do que no grupo controle. Concluíram então que o método de oferecer chupeta a bebês prematuros durante a alimentação por sonda reduz o período de transição dos bebês para alimentação oral e a duração da internação hospitalar. Além disso, as chupetas podem ser usadas durante a alimentação por sonda e na transição da gavagem para a alimentação oral e para a amamentação em bebês prematuros, para estimular o desenvolvimento da capacidade de sucção.

2.1.3 – Malefícios da chupeta

Dentre os potenciais riscos do uso da chupeta relata-se o desmame precoce; otite média; disfunção temporo-mandibular, pois chupar chupeta pode ser considerada uma forma de parafunção oral; deformidade dentária e esquelética; transferência de patógenos para cavidade oral; e cárie dentária em crianças, quando as chupetas são revestidas com substâncias açucaradas (GEDERI et al., 2013).

Encontra-se também uma associação entre o uso de chupeta e o risco de interrupção/diminuição do aleitamento materno exclusivo durante os primeiros seis meses de vida, apoiando a atual recomendação da Organização Mundial de Saúde, entretanto mais estudos consistentes são necessários para avaliar os riscos e benefícios do uso da chupeta em bebês (BUCCINI et al., 2016).

2.2 – Contaminação em crianças por microrganismos patogênicos

A diarreia continua sendo uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade entre bebês e crianças nos países em desenvolvimento (NAKHJAVANI et al., 2013). O patógeno bacteriano mais comumente associado a formas endêmicas de diarreia infantil é a *Escherichia coli*, que pode ser identificada em cerca de 50% dos casos, como apresentado por Chandra et al. (2012).

As cepas de *Escherichia coli* diarreio gênica (ECD) são uma das principais causas de diarreia em crianças menores de 5 anos em todo o mundo. A patogenicidade da ECD depende da interação das bactérias com fatores ambientais, incluindo a microbiota intestinal do hospedeiro (GALLARDO et al., 2017).

Benevides-Matos et al. (2017) avaliaram amostras fecais de 470 crianças diarreicas (0 a 72 meses) e 407 crianças sem diarreia (controles). Um total de 1156 cepas de *E. coli* foram isoladas dos espécimes fecais, concluindo que esse tipo microbiano é a principal causa de diarreia em crianças.

A doença neonatal é uma das principais causas de morte em todo o mundo, e a sepse é um dos principais contribuintes. Hamer et al., em 2015, avaliaram a etiologia da bacteremia em 8889 crianças com menos de 2 anos, de seis países (Bangladesh, Bolívia, Gana, Índia, Paquistão e África do Sul) e em 83% dos casos a *Escherichia coli* foi a espécie mais comumente isolada responsável pela bacteremia em crianças neonatais.

Staphylococcus aureus também são patógenos nosocomiais que podem causar infecções graves em crianças. Nelson-Filho et al., em 2013, avaliaram a dinâmica da colonização microbiana da cavidade oral de recém-nascidos. Foram coletadas oitenta e uma amostras da microbiota oral a partir de 51 recém-nascidos saudáveis, entre 10 min e 53 h após o nascimento. Os autores observaram que entre 24 e 53 h, foram detectados *S. aureus* em 33,3% das amostras. Relataram também a adoção de rigorosas medidas higiênicas pela mãe e pela equipe de enfermagem deve ser enfatizada para retardar a ocorrência de infecções causadas por microrganismos em recém-nascidos. Além disso, os procedimentos hospitalares

devem ser assépticos e as intervenções invasivas devem ser minimizadas o máximo possível.

Carvalho et al., em 2006, realizaram trabalho *in vivo* em 56 crianças de 1 a 5 anos que apresentavam cárie precoce da infância e relacionaram com a presença de *S. mutans* e *Candida* em comparação com crianças com cárie e crianças livres de cárie na infância. Foram coletadas amostras de dentina infectada para comparar a frequência desses microrganismos nos sítios analisados. Os autores concluíram que a frequência de *C. albicans* no grupo de crianças com cárie precoce na infância foi maior quando comparada ao grupo cárie e ao grupo livre de cárie, sugerindo uma associação significativa entre a presença de *C. albicans* e o início da cárie na infância.

O portador de candidíase assintomático tem sido extensivamente estudado em adultos, mas raramente em lactentes. Darwazeh e Al-Bashir, em 1995, realizaram uma investigação em duzentos e seis lactentes, na faixa etária foi entre 2 e 11 meses, para determinar o transporte oral assintomático de espécies de *Candida* em lactentes saudáveis e sua relação ao sexo e ao uso de chupeta. As espécies de *Candida* foram isoladas em 48% dos indivíduos, sendo mais frequente nos meninos (53%) do que nas meninas (41,7%), sendo a *Candida albicans* a espécie mais frequentemente isolada. A análise estatística também mostrou uma frequência significativamente maior de isolamento de candidíase em lactentes que usam rotineiramente chupetas, em comparação àqueles que não usavam. Em conclusão ao estudo, as espécies de *Candida* constituíram parte da flora oral comensal em cerca de 50% dos lactentes saudáveis com menos de um ano de idade e embora as possíveis rotas de aquisição dessas espécies fúngicas na cavidade oral sejam múltiplas, a sucção rotineiramente de chupeta parece ser significativa, mesmo em bebês saudáveis.

2.3 – Contaminação em chupetas e os métodos de desinfecção

Brook e Gober (1997) investigaram a presença microrganismos na superfície de 40 chupetas usadas por crianças na faixa etária de seis meses a três anos, com otite média aguda. O número de colônias foi contado e os microrganismos foram identificados. Os microrganismos foram isolados da superfície de apenas 21 chupetas

e dentre os microrganismos isolados a *Candida albicans* estava presente em cinco chupetas e em duas chupetas foram isolados *Staphylococcus aureus*.

Comina et al., em 2006, avaliaram a contaminação microbiana na superfície do bico de 25 chupetas coletadas em creches, sendo 9 chupetas com bico de silicone e 16 com bico de látex. Foi confirmada a presença de biofilme em 80% das chupetas estudadas. O biofilme amadureceu em 36% dessas, e as chupetas com bico de látex foram mais contaminadas do que as chupetas com bico de silicone. Os dois principais gêneros isolados foram *Staphylococcus* e *Candida*. Os resultados confirmam que as chupetas podem ser potenciais reservatórios de infecções e necessitam de rigorosas técnicas de higiene e uma eficiente limpeza anti-biofilme.

Silva et al. (2008) avaliaram as alterações superficiais e a presença de *C. albicans* e *S. mutans* na superfície de 40 chupetas com bicos de látex e silicone, que foram contaminados e descontaminados através da fervura em água durante 5 e 10 minutos e em forno de microondas por 5 minutos. Através da análise por microscopia eletrônica de varredura, os autores observaram que as maiores alterações superficiais foram nas amostras de látex, quando comparadas às de silicone. Relataram também que, independentemente do tratamento térmico, todas as amostras revelaram a ausência de *S. mutans* e *C. albicans*.

Silveira et al., em 2009, avaliaram o crescimento e desenvolvimento de biofilmes isolados de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* em 6 bicos de silicone e 6 bicos de látex. Os autores observaram que todas as espécies de *Candida* usadas no estudo foram capazes de formar biofilme em estruturas de látex e silicone, no entanto, a *C. albicans* mostrou uma capacidade ligeiramente maior de formar biofilme em comparação com as outras espécies. Relataram também que, comparativamente, o látex apresenta uma superfície rugosa e irregular, com fendas e depressões, enquanto o silicone apresenta uma superfície mais regular, sem fissuras ou fendas. Para tanto, concluíram que os bicos de silicone são mais resistentes que os de látex, em relação à formação de biofilme por espécies de *Candida* e que a espécie *C. albicans* tem uma maior capacidade de aderir a ambos quando comparada com as outras espécies desse fungo.

Chamele et al. (2012) avaliaram *in vitro* a contaminação de 60 chupetas por *Streptococcus mutans*, e a eficácia do micro-ondas na potência 7, por 7 minutos e de

quatro sprays de clorexidina 0,12% na desinfecção dessas chupetas. Os autores concluíram que tanto a clorexidina quanto o micro-ondas foram eficientes na desinfecção das chupetas, em 100% dos casos.

Silva et al. (2013) realizaram um estudo cujo objetivo foi detectar a presença de microrganismos indicadores de contaminação, em bicos de chupetas de 35 crianças, de ambos os sexos, que frequentam instituições de educação infantil. Os resultados revelaram que 57,1% das chupetas apresentaram coliformes totais e dentre estas, 75% apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes (fecais). Concluiu-se então, que a chupeta é um possível transmissor de microrganismos e sua utilização deve ser desaconselhada por profissionais de saúde, educadores e pais.

Abreu et al., em 2016, realizaram um estudo prospectivo, descritivo e observacional onde foram coletas e analisadas 72 chupetas de crianças de ambos os sexos, com idade entre um e seis anos, matriculados em uma escola estadual de ensino infantil, e também aplicaram um questionário semiestruturado aos pais, com o intuito de identificar comportamentos, hábitos de higiene e cuidados com a chupeta. Foi encontrado, em quatro amostras, a presença de *Candida albicans*, não sendo detectados enteroparasitas. Foi observado também que 9,72% das chupetas nunca são limpas antes de serem oferecidas às crianças, mais de 20% delas não são guardadas em lugares adequados, e 9,32% das mães tinham vago conhecimento sobre a transmissão de parasitas pela chupeta. Concluíram então, que há a necessidade de realizar orientações quanto à higiene, manutenção e armazenamento das chupetas.

Nelson-Filho et al. (2015) avaliaram a contaminação microbiana de chupetas por *Streptococcus Mutans* e a eficácia de diferentes métodos de descontaminação: spray de clorexidina 0,12%, imersão da chupeta em água fervente por 15 minutos e uso de um limpador antisséptico de escovas de dente (Brushtox®). Como conclusão do trabalho acharam que a solução de clorexidina 0,12% e a imersão em água fervente promoveu melhor desinfecção das chupetas quando comparado com limpador antisséptico de escovas de dente (Brushtox®).

Pedroso et al. (2018) em seu estudo, avaliaram o uso de soluções de vinagre, peróxido de hidrogênio, bicarbonato de sódio e clorexidina a 0,12% para a desinfecção

de chupetas. As substâncias foram testadas para atividade antimicrobiana em *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Além disso, o efeito da substância mais eficaz foi testado contra biofilmes polimicrobianos com o objetivo de imitar a colonização multiespecífica encontrada nas chupetas. Os autores demonstraram que todas as soluções testadas foram capazes de reduzir significativamente as células viáveis de *S. pyogenes*, *S. mutans* e *E. coli* dos biofilmes. Foi observada uma redução estatisticamente significativa de células viáveis em biofilmes de *S. aureus* após tratamento com 70% de vinagre de maçã, em comparação com os outros tratamentos. Verificou-se também que 70% de peróxido de hidrogênio foi particularmente eficaz contra *E. coli*, sendo capaz de reduzir as células viáveis de Enterobacterias e pseudomonas de um biofilme polimicrobiano formado em uma chupeta. Como conclusão do trabalho relataram que soluções de 70% de peróxido de hidrogênio mostraram-se como uma boa alternativa ao digluconato de clorexidina na desinfecção de chupetas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, a efetividade de quatro diferentes soluções para desinfecção de chupetas: clorexidina, spray higiênico bucal infantil, extrato aquoso de própolis, e água mineral e detergente; frente à contaminação em laboratório por três diferentes microrganismos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3.2 Objetivo específico

Comparar o efeito antimicrobiano das diferentes soluções de desinfecção e sua eficiência frente aos microrganismos.

Verificar a porcentagem de redução da contagem dos microrganismos das soluções para desinfecção e a efetividade das soluções.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Chupetas

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (InBio) e foi composto por 180 chupetas com bico ortodôntico de silicone (Mamita[®], São Paulo – SP, Brasil) e de mesmo lote (lote número 804/0), que foram embaladas uma a uma em papel grau cirúrgico (Medstéril[®], São Paulo – SP, Brasil, lote 759/13), seladas (Cristófoli[®], Campo Mourão – PR, Brasil) e utilizadas após a esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos (Autoclave vertical modelo 103 “Fabbe”, São Paulo – SP, Brasil). Essas chupetas foram divididas aleatoriamente em seis grupos, de 30 chupetas cada, de acordo com o método utilizado na desinfecção das mesmas, sendo: CTN – controle negativo, CTP – controle positivo, CLX – clorexidina 0,12% (Periogard[®], Colgate, São Bernardo do Campo – SP, Brasil, lote 8186BR122A), SHB – spray higiênico bucal infantil (Inphoral[®], São Paulo – SP, Brasil, lote 11845), EAP – extrato aquoso de própolis sem álcool (Propomax[®], Apis Flora, Ribeirão Preto – SP, Brasil, lote 003003318) e AMD – água mineral (Água Mineral Crystal[®], Bauru – SP, Brasil, lote 31348) e detergente (Lava-louças Ype[®] Clear, Amparo – SP, Brasil, lote 173054) (Quadro 1 e Figura 1). Para cada grupo, com exceção do CTN, uma amostra de 10 chupetas foi contaminada por um microrganismo diferente, dividindo os grupos em subgrupos: *Candida albicans* (CA), *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichia coli* (EC). O grupo controle negativo (CTN) foi composto por uma amostra de 30 chupetas estéreis, que passaram por todos os processos do estudo porém, sem contaminação pelas cepas, para avaliar se os meios não estavam sendo contaminados por outro tipo de microrganismo; e o grupo controle positivo (CTP) foi composto por uma amostra de 30 chupetas contaminadas com as cepas do estudo (n=10 para cada microrganismo do estudo), que passaram por todo o processo porém, sem sofrer a desinfecção, para controlar se as chupetas estavam sendo realmente contaminadas pelos microrganismos (Figura 2).

Quadro 1. Composição das soluções utilizadas para a desinfecção.

Clorexidina 0,12% (Periogard®, Colgate, São Bernardo do Campo – SP, Brasil, lote 8186BR122A)	Gluconato de Clorexidina a 0,12%.
Spray Higiênico Bucal (Inphoral®, São Paulo – SP, Brasil, lote 11845)	Água, propileno glicol, sorbitol, glicerina, benzoato de sódio, lauriléter sulfato de sódio, sorbato de potássio, EDTA, fosfato de potássio, esteviosídeo, citrato de sódio, óleo de melaleuca, óleo essencial de mandarina, ácido cítrico.
Extrato Aquoso de Própolis Sem Álcool (Propomax®, Apis Flora, Ribeirão Preto – SP, Brasil, lote 003003318)	Água purificada e extrato de própolis sem álcool.
Detergente Lava-louça (Lava-louças Ype® Clear, Amparo – SP, Brasil, lote 173054)	Água, tensoativos aniônicos, sequestrante, conservantes, espessante, corante, fragrância, linear alquil benzeno sulfonato de sódio.

Fontes: Rótulo da embalagem de cada produto.

**Figura 1.** Soluções utilizadas na desinfecção.

Fontes: <https://www.paguemenos.com.br/antisseptico-bucal-colgate-periogard-sem-alcool-250ml/p>, <https://www.inphloral.com.br/products/spray-higienico-bucal-infantil>, <http://www.apisflora.com.br/produto/propomax-extrato-de-propolis-sem-alcool-30-ml/>, <https://www.aquamineralscrystal.com.br/pt/produtos.html>, <https://www.ype.ind.br/produtos/lava-loucas-ype>, acesso 24/07/2019.

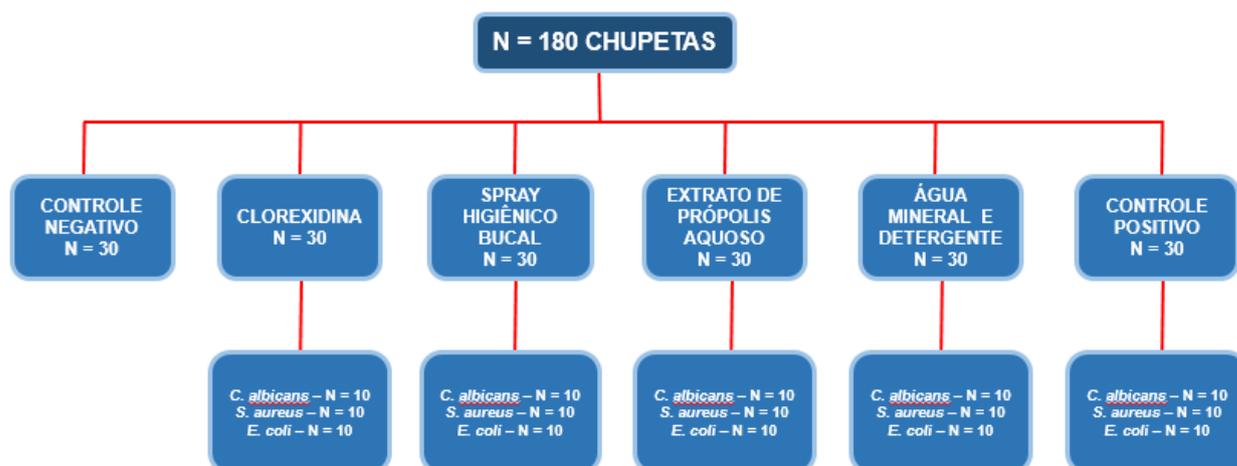


Figura 2. Divisão dos grupos.

Todo o estudo foi realizado dentro da capela de fluxo laminar (FUV 09, Veco, Campinas – SP, Brasil) para evitar contaminação.

4.2 Microrganismos

As bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e o fungo *Candida albicans* (ATCC 18804) foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (InBio/UFMS).

4.2.1 Cultura estoque

A cultura estoque de cada bactéria foi mantida congelada em Eppendorf contendo 50 mL de solução de congelamento (20 mL de glicerol e 30 mL de BHI caldo) a 0°C em refrigerador (Consul®, Joinville – SC, Brasil).

4.2.2 Preparo das culturas

Para a preparação das culturas, a cultura estoque das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram descongeladas a temperatura ambiente e uma alíquota de 50 µL foi transferida para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI (Ion®, Paraná, Brasil). Esse tubo foi incubado em estufa (BOD Luca-161/03, Lucadema, São José do Rio Preto – SP, Brasil) a 37°C por 18 horas. Decorrido esse tempo, a cultura em caldo foi semeada em placas de ágar BHI (HiMedia®, Brasil), com alça descartável, seguindo a técnica de esgotamento para obtenção de colônias isoladas e incubada novamente em estufa a 37°C por 24 horas (PEKER et al., 2014).

Já a cultura estoque de *Candida albicans* foi descongelada a temperatura ambiente, semeada em meio sabouraud dextrose (Prodimol Biotecnologia, Minas Gerais, Brasil) com auxílio de uma alça descartável, também seguindo a técnica de esgotamento para obtenção de colônias isoladas, e incubada em estufa a 37°C por 48 horas (SILVEIRA et al., 2009).

4.2.3 Preparo do inóculo

Colônias isoladas, de tamanho uniforme, de cada microrganismo (Figura 3), foram inseridas em solução salina estéril (ADV Farma, Nova Odessa – SP, Brasil, lote 1808075) e a solução foi agitada durante 1 minuto em Vortex (AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). A concentração dessa solução foi mensurada em espectrofotômetro (UV 1803/VIS 1810, Labnova, Santo André – SP, Brasil) sob comprimento de onda de 625 nm, até que se obtivesse o valor de absorbância entre 0,08 a 0,1 (Figura 4), o que corresponde a uma quantidade aproximada de 10⁸ UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia por mililitro) e comparado ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland (CLSI, 2003).



Figura 3. Colônias isoladas de *Escherichia coli*.
Fonte: Própria, 2019.

Após a obtenção do valor de absorbância adequado, a solução foi submetida a diluição seriada decimal. Para essa diluição, 1 mL da solução contendo 10^8 UFC/mL foi transferido para 9 mL de solução salina estéril. A seguir, esse procedimento foi realizado por mais uma vez para que se obtivesse a concentração de microrganismos de 10^6 UFC/mL (inóculo) (PEDROSO et al., 2018; CHAMELE et al., 2012; NCCLS, 2003).

4.2.4 Contaminação das chupetas

As chupetas foram colocadas dentro de frascos de plásticos com tampa (J Prolab[®], São José dos Pinhais – PR, Brasil), semelhantes a coletores de urina, estéreis, e os bicos foram totalmente imersos no inóculo (volume de 40 mL) (PEDROSO et al., 2018) (Figura 5). Os frascos foram tampados, a meia rosca, e incubados em estufa a 37°C por 24 horas para as bactérias (PEKER et al., 2014; DEVARAJ et al., 2016) e por 48 horas para a levedura (SILVEIRA et al., 2009). Decorrido o tempo, as chupetas foram

transferidas para béqueres de vidro de 10 mL, estéreis, onde elas permaneceram por 1 minuto para que escorresse o excesso de líquido dos bicos.



Figura 4. Contaminação das chupetas.
Fonte: Própria, 2019.

4.2.5 Descontaminação das chupetas

Para a descontaminação dos bicos foram utilizados os seguintes métodos:

- Grupo CLX, EAP e SHB - aplicação de 4 borrifadas de cada solução, sem intervalos entre as aplicações, por todo o bico da chupeta (PEDROSO et al., 2018) (Figura 6);
- Grupo AMD - A descontaminação com água e detergente foi feita em duas etapas, com o intuito de simular uma lavagem comum com água e sabão. Inicialmente foi preparada 40 mL de uma solução, em frasco de plástico estéril com tampa, contendo 3 gotas de detergente e 40 mL de água mineral. A chupeta contaminada foi inserida nessa solução, o

frasco tampado e agitado durante 1 minuto no Vortex. Posteriormente essa chupeta foi inserida em outro frasco de plástico estéril com tampa, contendo somente 40 mL de água mineral, e levada ao Vortex novamente por mais 1 minuto.



Figura 5. Borrifadas das soluções desinfetantes.
Fonte: Pedroso et al., 2018.

4.2.6 Contagem dos microrganismos

Após as descontaminações, os bicos foram lavados com solução salina estéril (PEDROSO et al., 2018) durante 30 segundos. Foi cortado 1,5 cm do bico de cada chupeta, a partir da ponta, com tesoura estéril, e esses cortes foram inseridos em erlenmeyers de vidro estéril contendo 30 mL de solução salina estéril.

Os bicos imersos nessa nova solução salina foram agitados durante 1 minuto para que os microrganismos desprendessem do bico e passassem para a solução. Após esse processo, a solução foi diluída três vezes, 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , em Eppendorf e semeada em placas de ágar BHI pelo método de plaqueamento por gotas (*drop plate*) (Figura 7). Cada placa foi dividida em 4 quadrantes, onde cada quadrante representava uma diluição. Foram colocadas três gotas isoladas contendo $10 \mu\text{L}$ de material biológico diluído em cada quadrante. Após a absorção da gota pelo ágar as placas foram incubadas em estufa BOD, a 37°C por 24 horas para a *E. coli* e *S. aureus*

e por 48 horas para a *C. albicans*, para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) (Bac-counter, Hexibac, Eximlab, São Paulo – SP, Brasil) de cada microrganismo.

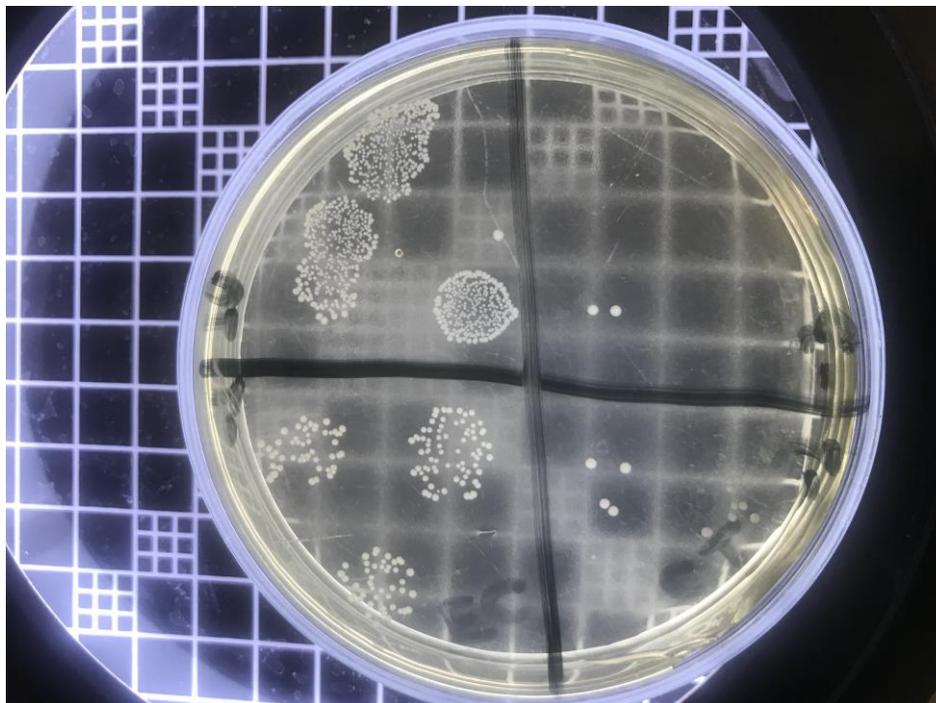


Figura 6. Método de plaqueamento por gotas.
Fonte: Própria, 2019.

4.3 Análise estatística

Inicialmente, realizou-se a análise estatística descritiva objetivando caracterizar a amostra. Foram calculadas as medidas de tendência central e de variabilidade para as variáveis quantitativas. O pressuposto de normalidade dos dados não foi verificado após utilizar o teste de Shapiro-Wilk. Nesse sentido, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de médias (pós-teste Bonferroni) para determinar diferenças entre os grupos em relação à contagem de microrganismos. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$ (LARSON; FARBER, 2016). Todas as análises foram conduzidas com o auxílio do *software* IBM SPSS Statistics versão 20.0, considerando um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

De acordo com a Tabela 1, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e todos os demais grupos para *Candida albicans* ($p < 0,001$). A comparação múltipla de médias/medianas revelou ausência de diferenças significativas entre CTN e SHB; CLX e SHB; e entre CLX, EPA e AMD.

Tabela 1. Análise comparativa da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Candida albicans*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Grupo	Média	DP	Mediana	IIQ	
				P25	P75
CTN	0,00 ^A	0,00	0,00	0,00	0,00
CTP	19,67 ^D	18,79	12,50	7,08	28,33
CLX	0,33 ^{B,C}	0,44	0,17	0,00	0,67
SHB	0,10 ^{A,B}	0,23	0,00	0,00	0,08
EPA	0,83 ^C	0,82	0,67	0,25	1,17
AMD	1,03 ^C	0,82	0,84	0,33	1,75
Kruskal-Wallis (p-valor)	< 0,001				

Nota. CTN = controle negativo; CTP = controle positivo; CLX = clorexidina; SHB = spray higiênico bucal; EPA = extrato de própolis aquoso; AMD = água mineral e detergente; DP = desvio-padrão; IIQ = intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

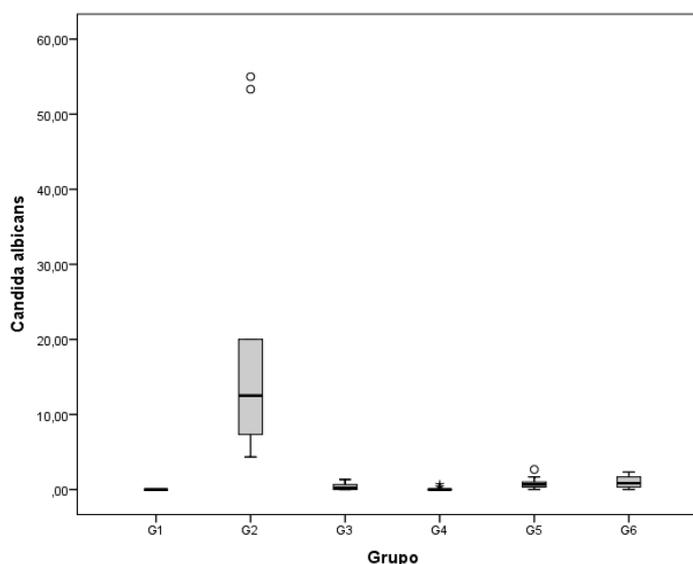


Figura 7. Gráfico *Boxplot* da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Candida albicans*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Nota. G1 = controle negativo; G2 = controle positivo; G3 = clorexidina; G4 = spray higiênico bucal; G5 = extrato de própolis aquoso; G6 = água mineral e detergente.

Conforme descrito na Tabela 2, observou-se diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e todos os demais grupos para *Staphylococcus aureus* ($p < 0,001$). A comparação múltipla de médias/medianas indicou ausência de diferenças significativas entre CTN, SHB e AMD; e entre CLX, EPA e AMD.

Tabela 2. Análise comparativa da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Staphylococcus aureus*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Grupo	Média	DP	Mediana	IIQ	
				P25	P75
CTN	0,00 ^A	0,00	0,00	0,00	0,00
CTP	3,73 ^C	2,89	3,33	1,00	5,16
CLX	0,27 ^B	0,44	0,00	0,00	0,41
SHB	0,00 ^A	0,00	0,00	0,00	0,00
EPA	0,43 ^B	0,86	0,00	0,00	0,75
AMD	0,00 ^{A,B}	0,00	0,00	0,00	0,00
Kruskal-Wallis (p-valor)	< 0,001				

Nota. CTN = controle negativo; CTP = controle positivo; CLX = clorexidina; SHB = spray higiênico bucal; EPA = extrato de própolis aquoso; AMD = água mineral e detergente; DP = desvio-padrão; IIQ = intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

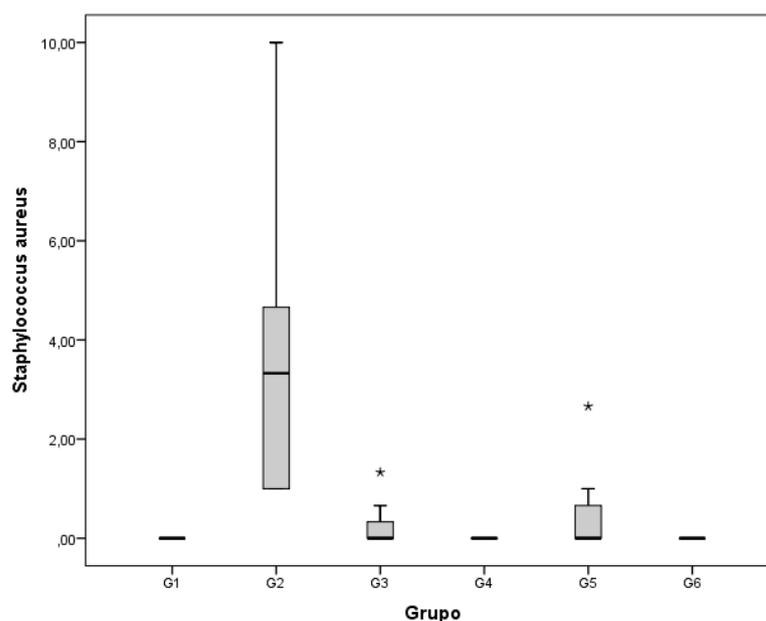


Figura 8. Gráfico *Boxplot* da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Staphylococcus aureus*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Nota. G1 = controle negativo; G2 = controle positivo; G3 = clorexidina; G4 = spray higiênico bucal; G5 = extrato de própolis aquoso; G6 = água mineral e detergente.

Como descrito na Tabela 3, constatou-se diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e todos os demais grupos para *Escherichia coli* ($p < 0,001$). A comparação múltipla de médias / medianas sinalizou ausência de diferenças significativas entre CTN, SHB e AMD. Entre CTN, CLX e EPA houve diferença significativa, com maior contagem de microrganismos para o CLX e EPA ($p < 0,05$).

Tabela 3. Análise comparativa da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Escherichia coli*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Grupo	Média	DP	Mediana	IIQ	
				P25	P75
CTN	0,00 ^A	0,00	0,00	0,00	0,00
CTP	5,70 ^C	1,18	5,50	4,92	6,75
CLX	1,02 ^B	0,87	0,66	0,53	1,66
SHB	0,00 ^A	0,00	0,00	0,00	0,00
EPA	0,47 ^B	0,48	0,33	0,00	1,00
AMD	0,00 ^A	0,00	0,00	0,00	0,00
Kruskal-Wallis (p-valor)	< 0,001				

Nota. CTN = controle negativo; CTP = controle positivo; CLX = clorexidina; SHB = spray higiênico bucal; EPA = extrato de própolis aquoso; AMD = água mineral e detergente; DP = desvio-padrão; IIQ = intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

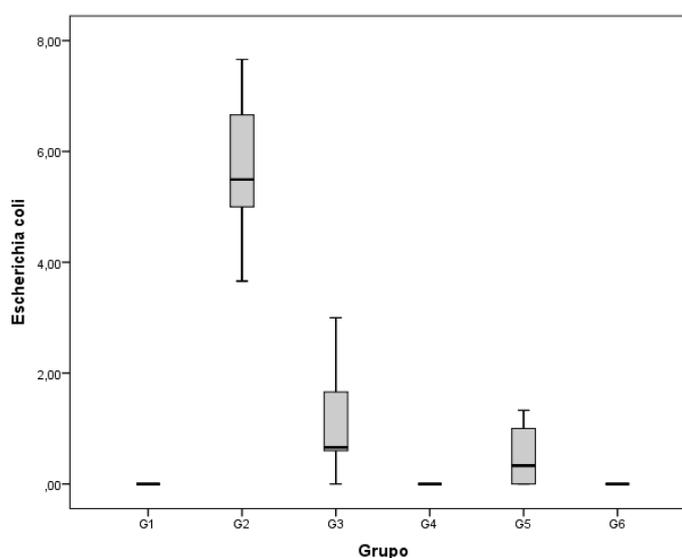


Figura 9. Gráfico *Boxplot* da quantidade de microrganismos (UFC/mL) (*Escherichia coli*) na diluição de 10^{-2} de acordo com os grupos avaliados.

Nota. G1 = controle negativo; G2 = controle positivo; G3 = clorexidina; G4 = spray higiênico bucal; G5 = extrato de própolis aquoso; G6 = água mineral e detergente.

Tabela 4. Análise comparativa da porcentagem de redução de microrganismos de cada solução desinfetante.

	<i>Candida albicans</i> (%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (%)	<i>Escherichia coli</i> (%)
CTN	100	100	100
CTP	0	0	0
CLX	98,3	92,7	82,1
SHB	99,4	100	100
EAP	95,7	88,4	91,7
AMD	94,7	100	100

Nota. CTN = controle negativo; CTP = controle positivo; CLX = clorexidina; SHB = spray higiênico bucal; EPA = extrato de própolis aquoso; AMD = água mineral e detergente.

6 DISCUSSÃO

Como qualquer outro objeto levado a boca, devido seu contato constante com a saliva e com a microbiota oral, a chupeta apresenta-se como um potencial reservatório de microrganismos, sendo capaz de levar ao aparecimento de infecções (CASTILHO; ROCHA, 2009). Quando elas não estão em uso, ficam expostas ao ambiente externo e vulneráveis a contaminação (COMINA et al., 2006).

O presente estudo utilizou chupetas com bico de silicone, por ser um material com menos potencial alergênico em comparação aos bicos de látex e por apresentar uma superfície mais regular, sem fissuras ou fendas, sendo assim, menos propenso a colonização de microrganismos (SILVEIRA et al., 2009). No entanto, os bicos de silicone ainda têm potencial para adesão de microrganismos e podem ser uma fonte considerável de infecções (COMINA et al., 2006).

Hoje, com a vida agitada do mundo moderno, os métodos para a desinfecção de chupetas devem ser simples, práticos, de fácil acesso, eficazes, custo-efetivos e de fácil implementação (KOMIYAMA et al., 2010; NELSON-FILHO et al., 2015). Entretanto, na literatura encontramos poucos trabalhos sobre desinfecção de chupetas como levá-las ao micro-ondas na potência 07 por 07 min (CHAMELE et al., 2012), na potência máxima por 05 min ou levá-las à fervura em água a 100°C por 5 ou 10 min (SILVA et al., 2008), ou até mesmo o uso do vinagre de maçã a 70% e do peróxido de hidrogênio a 70%, que são soluções não viáveis por serem de difícil acesso. Estes métodos estão disponíveis para os responsáveis quando estão em sua residência ou em locais preparados para o recebimento de bebês, o que não ocorre em todos os locais públicos, por isso, o uso de frascos com dispositivos para borrifadas facilitaria a aplicação da solução para desinfecção quando necessário em qualquer local. (PEDROSO et al., 2018).

O uso de borrifadas de clorexidina a 0,12% foi previamente considerado a substância mais indicada para desinfecção de chupetas (NELSON-FILHO et al., 2015). Entretanto, o uso da clorexidina é controverso, particularmente devido ao custo, quando comparado a outras soluções de desinfecção (NELSON-FILHO et al., 2015), por ser uma solução que apresenta efeito residual desagradável na cavidade bucal, e pela possibilidade de irritabilidade da mucosa oral (PEGORARO et al., 2014).

Frente a isso, o presente estudo buscou encontrar soluções desinfetantes práticas e naturais para auxiliar as mães nos cuidados diários na desinfecção de chupetas.

No grupo das chupetas contaminadas por *Candida albicans*, todas as soluções de desinfecção foram eficientes, mostrando uma porcentagem de redução superior a 90%. Pode-se identificar que o spray higiênico bucal não diferiu estatisticamente do grupo controle negativo, apresentando 95,8% de redução dos microrganismos. Encontra-se na literatura vários trabalhos que corroboram para nosso resultado, mostrando o efeito antimicrobiano do TTO frente a *Candida albicans* (COX et al., 2000; HAMMER et al., 2002; HAMMER et al., 2004).

Também no grupo de chupetas contaminadas com a *C. albicans*, a clorexidina não diferiu de modo significativo do spray higiênico bucal, demonstrando 98,3% de redução. A clorexidina a 0,12% mostra-se eficaz contra a *C. albicans* em diversos trabalhos (BORGES et al., 2010; KOMIYAMA et al., 2010; SOARES et al., 2011; BALLIANA et al., 2014; CELEPKOLU et al., 2014; RONANKI et al., 2016), confirmando nossos resultados, quando comparada ao vinagre branco, triclosan e perborato (KOMIYAMA et al., 2010); com eficácia comparável a enxaguantes bucais contendo clorexidina a 0,1% ou 0,2% (RONANKI et al., 2016); eficácia semelhante ao cloreto de cetilpiridino, quando comparados ao peróxido de hidrogênio a 1,5%, e ao mentol, timol, eucaliptol e salicilato de metila (BALLIANA et al., 2014); na desinfecção de escovas de dente (KOMIYAMA et al., 2010; CELEPKOLU et al., 2014).

Ainda nas chupetas contaminadas com *C. albicans*, a clorexidina também revelou ausência de diferenças significativas com o extrato aquoso de própolis (95,8% de redução) e com a água mineral e detergente (94,7% de redução). Makabe, em 2015, testou a atividade de inibição da clorexidina 0,12%, do extrato etanólico de própolis 6% e da água filtrada sobre leveduras através da higienização da boca de pacientes internados na UTI. A autora concluiu que a higienização com a água filtrada reduz o isolamento de leveduras e fungos filamentosos em consequência da atividade mecânica de remoção de resíduos, e que a clorexidina a 0,12% e o extrato etanólico de própolis a 6% inibiram o crescimento de leveduras. Koo et al. (2000) e Akca et al. (2016), testaram, *in vitro*, a ação do extrato etanólico de própolis sobre cepas de *C. albicans*, e ambos os autores concluíram que o extrato de própolis inibiu significativamente o crescimento do fungo. Todos esses achados corroboram com os

resultados encontrados no nosso trabalho, mesmo que em nosso trabalho tenhamos utilizado extrato aquoso de própolis e água mineral com detergente.

No grupo de chupetas contaminadas por *Staphylococcus aureus*, todas as soluções desinfetantes foram eficientes, apresentando um alto percentual de redução de microrganismos. Foi verificado que o spray higiênico bucal e a água mineral com detergente não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo, apresentando percentual de redução de 100%. Há na literatura trabalhos que mostram a efetividade do óleo essencial de melaleuca sobre o *S. aureus*, como o de Cox et al., 2000 e do de Ditterich et al., 2007. Basman et al., 2016, realizaram um estudo com 60 escovas de dente, no qual, compararam a eficácia da máquina de lavar louças e de soluções desinfetantes como clorexidina 0,12%, vinagre branco, hipoclorito de sódio 2%, enxaguante bucal contendo óleos essenciais e álcool e água de torneira, na desinfecção frente ao *S. aureus*. Os autores concluíram que todos os métodos testados, incluindo agentes químicos antimicrobianos e o uso de máquina de lavar louça, foram eficazes para reduzir as contagens bacterianas em escovas dentais, confirmando os resultados encontrados em nosso estudo.

Ainda no grupo de chupetas contaminadas com *S. aureus*, a clorexidina (92,7% de redução) não diferiu de modo significativo do extrato de própolis aquoso (88,4% de redução) e da água mineral com detergente (100% de redução). Estudos mostram que o extrato etanólico de própolis pode ser uma alternativa natural e confiável de antimicrobianos utilizados na boca, frente a bactérias como *S. aureus* (KOO et al., 2000), a fim de evitar os efeitos colaterais da clorexidina (AKCA et al., 2016), entretanto, deve ser considerado a possibilidade de riscos de reações alérgicas frente ao própolis em crianças na primeira infância (RAJPARA et al., 2009).

Em contrapartida, Peker et al., em 2014, avaliaram a efetividade de métodos de desinfecção como hipoclorito de sódio 1%, 100% e 50% de vinagre branco, micro-ondas na potência máxima por 3 min, raio ultravioleta na potência máxima por 20 min, enxaguante bucal contendo própolis e água de torneira, em 280 escovas de dente frente à contaminação por *S. aureus* e *E. coli*. Os autores concluíram que enxaguante bucal contendo própolis foi o agente menos eficaz para todas as bactérias testadas. Concluíram também que 100% de vinagre branco foi considerado o método mais eficaz frente aos microrganismos, seguido do hipoclorito de sódio 1%, que é rentável e de fácil acesso.

Com relação ao uso da clorexidina como solução antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*, estudos atestam nossos resultados, mostrando o efeito antimicrobiano da clorexidina 0,12% frente a *S. aureus* (SEMENOFF et al., 2008; SCANNAPIECO et al., 2009; BORGES et al., 2010; KOMIYAMA et al., 2010; AKCA et al., 2016; BASMAN et al., 2016; RONANKI et al., 2016); para higienização de escovas de dente, quando comparada ao vinagre branco, triclosan e perborato (KOMIYAMA et al., 2010); com eficácia comparável a enxaguantes bucais contendo clorexidina a 0,1% ou 0,2% (RONANKI et al., 2016)

Pedroso et al. (2018) em seu estudo concluíram que soluções de 70% de peróxido de hidrogênio mostraram-se como uma boa alternativa ao digluconato de clorexidina 0,12% na desinfecção de chupetas contaminadas com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, entretanto, o uso rotineiro da solução de peróxido de hidrogênio a 70% não é viável. Com isso, justifica-se o uso de substâncias baratas para desinfecção dos bicos de chupeta, de fácil manuseio e que não apresentem efeito residual.

No grupo de chupetas contaminadas pela *Escherichia coli* também pode-se observar que todas as soluções desinfetantes foram eficientes na descontaminação, demonstrando elevados percentuais de redução de microrganismos. Pode-se identificar ausência de diferença significativa entre o grupo controle negativo, o spray higiênico bucal e a água mineral com detergente, ambos apresentando 100% de redução. Existem trabalhos na literatura que corroboram para nossos resultados, mostrando o efeito antimicrobiano do óleo essencial de melaleuca sobre a *E. coli* (COX et al., 2000; DITTERICH et al., 2007), até quando comparado a eficácia da máquina de lavar louças e de soluções desinfetantes como clorexidina 0,12%, vinagre branco, hipoclorito de sódio 2%, enxaguante bucal contendo óleos essenciais e álcool e água de torneira (BASMAN et al., 2016).

Ainda no grupo da *E. coli*, houve diferença significativa entre o grupo controle negativo, a clorexidina (82,1% de redução) e o extrato aquoso de própolis (91,7% de redução), mostrando que essas substâncias foram menos eficazes na descontaminação, quando comparadas aos outros desinfetantes. Há na literatura artigos divergentes aos achados em nosso trabalho, mostrando o efeito antimicrobiano da clorexidina 0,12% frente a *Escherichia coli* (SOARES et al., 2011; CELEPKOLU et al., 2014; BASMAN et al., 2016), quando utilizada para desinfecção

de escovas de dente (CELEPKOLU et al., 2014), quando comparado a eficácia da máquina de lavar louças e de soluções desinfetantes como clorexidina 0,12%, vinagre branco, hipoclorito de sódio 2%, enxaguante bucal contendo óleos essenciais e álcool e água de torneira (BASMAN et al., 2016), isto pode ter ocorrido devido a nossas chupetas terem sido apenas borrifadas com as soluções e não imersas como nos estudos citados acima, o que faz a solução ficar menos tempo em contato com a superfície contaminada.

Com relação ao extrato aquoso de própolis, o trabalho de Peker et al (2014) corrobora com o resultado encontrado em nosso estudo. No qual, comparando a efetividade de métodos de desinfecção como hipoclorito de sódio 1%, 100% e 50% de vinagre branco, micro-ondas na potência máxima por 3 min, raio ultravioleta na potência máxima por 20 min, enxaguante bucal contendo própolis e água de torneira, em 280 escovas de dente frente à contaminação por *S. aureus* e *E. coli*. Os autores concluíram que enxaguante bucal contendo própolis foi o agente menos eficaz para todas as bactérias testadas.

A solução de água mineral e detergente foi utilizada para simular uma lavagem realizada rotineiramente em qualquer local e foi verificada a desinfecção significativa em todos os microrganismos testados quando comparados ao grupo controle positivo. Este resultado mostra que o efeito da lavagem mecânica também é eficaz na desinfecção de chupetas, sendo esta prática de baixo custo em relação as outras soluções analisadas, fácil de ser realizada e efetiva desde que tomado os devidos cuidados quanto a procedência da água utilizada (PRICE et al., 2016).

Ainda que tenhamos utilizado uma chupeta nova, e não uma chupeta que estava em uso, na qual a contaminação seria muito maior, o presente estudo mostrou que uma variedade de linhagens de referência (*C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*) é capaz de aderir e crescer nessa superfície, por meio da contagem das colônias isoladas no grupo controle positivo.

Mais estudos devem ser realizados para avaliar a presença de microrganismos viáveis após o processo de desinfecção e a avaliação de efeito residual das soluções nas chupetas, o que poderá causar alguma alteração na microbiota oral dos bebês.

7 CONCLUSÕES

Todas as soluções apresentaram efetividade na desinfecção de chupetas contaminadas com os microrganismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Para a *C. albicans* todas as soluções de desinfecção foram efetivas, com destaque para o spray higiênico bucal, que apresentou os melhores resultados.

Para o *S. aureus* e para a *E. coli*, todas as soluções foram efetivas na desinfecção, com destaque para o spray higiênico bucal e para a água mineral com detergente, que mostraram maior redução da contaminação das chupetas.

Para todas as soluções testadas, a porcentagem de redução de microrganismos foi superior a 82%, demonstrando que procedimentos fáceis, de baixo custo e mais acessível na rotina diária da família como a higienização com água mineral e detergente mostram que a ação mecânica de uma lavagem bem realizada pode levar a desinfecção de bicos de chupetas.

8 REFERÊNCIAS

Abreu PO, Grossi M, Hoerbe A, Santin LA, Silveira CB, Fernandes RD, Kurtz T, Bastos MD. Análise da contaminação de chupetas por enteroparasitas e fungos em escola de ensino fundamental. J. Health Biol Sci 2016; 4(4):240-244.

Akca AE, Akca G, Topçu FT, Macit E, Pıkdöken L, Özgen IS. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. BioMed Research Inter 2016; 1-8.

Álvarez T. El dolor en los neonatos. Enfoque diagnóstico y terapéutico. Iatreia 2000; 13(4):246-55.

Ayegül O, Elgin IE, Gulcin A, Nedim S. The efficacy of chlorhexidine spray vs mouthwash in the microbial contamination of child toothbrushes. J Dent Child 2007; 74:177-81.

Balliana RCS, Jamal CM, Maifrede SB, Araújo ML. Evaluation of the antifungal activity of plant extracts and oral antiseptics against *Candida albicans*. Braz Dent Sci 2014; 17(4):98-105.

Basman A, Peker I, Akca G, Alkurt MT, Sarikir C, Celik I. Evaluation of toothbrush disinfection via different methods. Braz Oral Res 2016; 30(6):1-6.

Benevides-Matos N, Pieri FA, Penatti M, Orlandi PP. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. Brazil Jour Microbiol 2015; 46(1):131-7.

Borges AH, Pedro FLM, Semenoff TDV, Porto AN, Semenoff-Segundo A, Buzulle SL. Antimicrobial effectiveness of different trademarks mouthwashes with and without alcohol against different organisms: in vitro study. *Rev Odonto Ciênc* 2010; 25(2):178-81.

Brook I, Gober AE. Bacterial colonization of pacifiers of infants with acute otitis media. *J Laryngol Otol* 1997; 111:614-5.

Bucini GS, Benício MHDA, Venancio SI. Determinantes do uso de chupeta e mamadeira. *Rev Sau Public* 2014; 48(4):571-82.

Buccini GS, Pérez-Escamilla R, Paulino LM, Araújo CL, Venancio SI. Pacifier use and interruption of exclusive breastfeeding: systematic review and meta-analysis. *Maternal & Child Nutrition* 2016; doi: 10.1111/mcn.12384.

Carrascoza KC, Possobon RF, Ambrosano GMB, Costa Júnior AL, Moraes ABA. Fatores determinantes do uso de chupeta entre crianças participantes de programa de incentivo ao aleitamento materno. *Rev CEFAC* 2014; 16(2):582-91.

Carvalho FG, Parisotto TM, Hebling J, Spolidorio DMP. Presence of *Candida* spp. In infants oral cavity and its association with early childhood caries. *Bras J Oral Sci* 2007; 20(6):1249-53.

Castilho SD, Rocha MAM. Uso de chupeta: história e visão multidisciplinar. *J Pediatr* 2009; 85(6):480-9.

Celepku T, Toptanci IR, Bucaktepe PGE, Sen V, Dogan MS, Kars V, Aslanhan H, Aslan I, Dal T, Yildiz I, Palanci Y. A microbiological assessment of the oral hygiene of 24-72-month-old kindergarten children and disinfection of their toothbrushes. *BMC Oral Health* 2014; 94(14):1-7.

Chamele J, Bhat C, Saraf T, Jadhav A, Beg A, Jagtap C, Ubeja R, Patil P. Efficacy of microwaves and chlorhexidine for disinfection of pacifiers and toothbrushes: an in vitro study. *The Jour of Contemp Dent Pract* 2012; 13(5):690-4.

Chandra BK, Singh G, Taneja N et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* as a predominant cause of paediatric nosocomial diarrhoea in India. *J Med Microbiol* 2012; 61:830-836.

Chouhan S, Sharma k, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils— Present Status and Future Perspectives. *Medicines*. 2017; 4(3): 58

CLSI. Clinical & Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard - Sixth Edition. Documents M7-A6 and M100-S13. Wayne, PA, USA; 2003.

Comina E, Marion K, Renaud FN, Dore J, Bergeron E, Freney J. Pacifiers: A microbial reservoir. *Nurs Health Sci* 2006; 8:216-23.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000; 88(1):170-5.

Darwazeh AMG, Al-Bashir A. Oral candidal flora in healthy infants. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 361.

Dejaraj S, Jagannathan N, Neelakantan P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus fecalis* in vitro. *Scientific Reports* 2016; DOI: 10.1038/srep24797.

Ditterich RG, Romanelli MCMOV, Rastelli MC, Portero PV, Santos EB. Atividade antimicrobiana in vitro de substâncias naturais presentes nos dentifrícios. *Odontol Clin Cient* 2007; 6(4):303-7.

Gallardo P, Izquierdo M, Vidal RM, Chamorro-Veloso N, Rosselló-Móra R, O’Ryan M, Farfán MJ. Distinctive gut microbiota is associated with diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Chilean children. *Frontiers and Cellular and Infection Microbiology* 2017; 7:1-10.

Ganguly S, Mitchell AP. 2011. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 14:380-5.

Geder A, Coomaraswamy K, Turner PJ. Pacifiers: a review of risks vs benefits. *Dent Update* 2013; 40:92–101.

Gray L, Garza E, Zageris D, Heilman KJ, Porges SW. Sucrose and Warmth for Analgesia in Healthy Newborns: An RCT. *Pediatr* 2015; 135(3):e607-16.

Hamer DH, Darmstadt GL, Carlin JB, Zaidi AKM, Yeboah-Antwi K, Saha SK et al. Etiology of bacteremia in young infants in six countries. *Pediatr Infect Dis J* 2015; 34:e1–e8.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J of Antimicrob Chemoth*, v.50, p.195-9, 2002.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.53, p.1081-5, 2004

Hardcastle T. Sucrose has been shown to have analgesic properties when administered to neonates and infants: is there the potential for its use in post-operative pain management? *Clin Feat* 2010; 20(1):19-22.

Inphoral. Disponível em: <<https://www.inphloral.com.br/products/lenco-higienico-bucal-infantil>>. Acesso em 23 de jul de 2019.

Kandasamy Y, Smith R, Wright IMR, Hartley L. Pain relief for premature infants during ophthalmology assessment. *J AAPOS* 2011; 15:276-80.

Komiyama EY, Back-Brito GN, Balducci I, Koga-Ito CY. Evaluation of alternative methods for the disinfection of toothbrushes. *Braz Oral Res* 2010; 24: 28 – 33.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch of Oral Biol* 2000; 45:141-8.

Kristoffersen L, Skogvoll E, Hafström M. Pain reduction on insertion of a feeding tube in preterm infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics* 2011; 127:e1449–54.

Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(4):343-7.

Lemes EF, Silva THMM, Correr AMA, Almeida EOC, Luchesi KF. Estimulação sensorial intra e extra-oral em neonatos prematuros: revisão bibliográfica. *Rev CEFAC* 2015; 17(3):945-55.

Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17(3):388-95.

Lubbe W, Ham-Baloyi W. When is the use of pacifier justifiable in the baby-friendly hospital initiative context? A clinician's guide. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2017; 17(17):1-10.

Makabe MLF. Higienização bucal com digluconato de clorexidina e extrato etanólico de própolis em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um Hospital Público na cidade de São Paulo - Brasil [tese]. São Paulo: Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2015.

McGarvey C, McDonnell M, Chong A, O'Regan M, Matthews T. Factors relating to the infant's last sleep environment in sudden infant death syndrome in the Republic of Ireland. *Arch Dis Child*. 2003; 88(12):1058–64.

Montero DA, Velasco J, Del Canto F, Puente JL, Padola NL, Rasko DA, Farfán M, Salazar JC, Vidal R. Locus and adhesion and autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific Reports* 2017; 7: 7011 DOI:10.1038/s41598-017-06999-y.

Moon RY, Faap MD. SIDS and other sleep-related infant deaths: evidence base for 2016 updated recommendations for a safe infants sleeping environment. *Pediatrics* 2016; 138(5):e1-e36.

Nakhjavani FA, Emaneini M, Hosseini H et al. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2013; 62:191-195.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 2000; 31(4):247-56.

Nelson-Filho P, Borba IG, Mesquita KSF, Silva RAB, Queiroz AM, Silba LAB. Dynamics of microbial colonization of the oral cavity in newborns. *J Bras Dent* 2013; 24(4):415-9.

Nelson-Filho P, Louvain MC, Macari S, Lucisano MP, Silva RAB, Queiroz AM, Gatón-Hernández P, Silva LAB. Microbial contamination and disinfection methods of pacifiers. *J Appl Oral Sci* 2015; 23(5):523-8.

Niemala M, Uhari M, Mottonen M. (1995) Pacifiers increase the risk of recurrent acute otitis media in children in day care centers. *Inter Jour Pediatric Otorhinolaryngology* 1995; 96:884-8.

Nunes ACL, Ramalho MOA, Macêdo VC, Frias PG, Silva ITC. Prevalência do uso de bicos artificiais em menores de um ano. *Rev Rene* 2012; 13(5):1182-90.

Oliveira RM, Silva APAD, Silva AVS, Chaves EMC, Silva LMS, Bezerra SC. Implementação de medidas para o alívio da dor em neonatos pela equipe de enfermagem. *Esc Anna Nery* 2011; 15(2):277-83.

Palomer LR. Caries dental en niño. Una enfermedad contagiosa. *Rev Chil Pediatr* 2006; 77(1):50-6.

Pedroso JF, Sangalli J, Brighenti FL, Tanaka MH, Koga-Ito CY. Control of bacterial biofilms formed on pacifiers by antimicrobial solutions in spray. *Inter Jour Paediatric Dentistry* 2018; DOI: 10.1111/ipd.12413.

Pegoraro J, Silvestri L, Cara G, Stefenon L, Mozzini CB. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina 0,12%. *J Oral Invest* 2014; 3(1):33-7.

Peker I, Akca G, Sarikir C, Alkurt MT, Celik I. Effectiveness of alternative methods for toothbrush disinfection: an in vitro study. *The Sci World Journ* 2014; 1-9.

Price E, Weaver G, Hoffman P, Jones M, Gilks J, O'Brien V, Ridgway G. Decontamination of breast pump milk collection kits and related items at home and in

hospital: guidance from a Joint Working Group of the Healthcare Infection Society and Infection Prevention Society. *J Hosp Infect.* 2016; 92:213-21.

Rajpara S, Wilkinson MS, King CM, Gawkrödger DJ, English JSC, Statham BN, et al. The importance of propolis in patch testing—a multicentre survey. *Contact Dermat* 2009; 61:287-90.

Ronanki S, Kulkarni S, Hemalatha R, Kumar M, Reddy P. Efficacy of commercially available chlorhexidine mouthrinses against specific oral microflora. *Indian J Dent Res* 2016; 27(1):48-53.

Say B, Simsek GK, Canpolat FE, Oguz SS. Effects of pacifier use on transition time from gavage to breastfeeding in preterm infants: a randomized controlled trial. *Breast Med* 2018; 13(6):433-7.

Semenoff TADV, Semenoff-Segundo A, Biasoli ER. Efetividade antimicrobiana in vitro de enxaguatórios bucais frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Odonto Ciênc* 2008; 23(4):351-4.

Sexton S, Natele R. Risks and benefits of pacifiers. *Am Fam Physician*, 2009; 79: 681-5.

Silva GAP. O uso de chupetas contribui para uma maior ocorrência de enteroparasitoses? *J Pediatr* 1997; 73(1):2-4.

Silva JM, Silva MPP, Yamaguchi MU, Gomes CF. Contaminação de chupetas utilizadas por crianças que frequentam instituição infantil pública e privada. *Pediatr Mod* 2013; 49(11):440-4.

Silva RC, Spolidorio DMP, Zuanon ACC, Godoi RHM. Pacifier disinfection procedure: superficial morphological aspects and microorganisms colonization. *RSBO* 2008; 5(1):30-3.

Silveira LC, Charone S, Maia LC, Soares RMA, Portela MB. Biofilm formation by candida species on silicone surfaces and latex pacifier nipples: an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent* 2009; 33(3):235-40.

Stevens B, Yamada J, Ohlsson A, Haliburton S, Shorkey A. Sucrose for analgesia in newborn infants undergoing painful procedures. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016; 7:1-361.

Tomasi E, Victora CG, Olinto MTA. Padrões e determinantes do uso de chupeta em crianças. *J Pediatr* 1994; 70(3):167-73.

Tomasi E, Victora CG, Post PR, Olinto MTA. Uso de chupeta em crianças: contaminação fecal e associação com diarreia. *Rev Sau Public* 1994; 28(5):373-9.