



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



JACQUELINE DE OLIVEIRA ZOCCOLOTTI

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS, MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UMA
RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESES APÓS IMERSÃO EM SOLUÇÕES DE
SABONETES LÍQUIDOS DESINFETANTES: EFEITO DE TEMPO DE IMERSÃO.**

Araraquara

2017



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



JACQUELINE DE OLIVEIRA ZOCCOLOTTI

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS, MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UMA RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESES APÓS IMERSÃO EM SOLUÇÕES DE SABONETES LÍQUIDOS DESINFETANTES: EFEITO DE TEMPO DE IMERSÃO.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge

Araraquara

2017

Zoccolotti, Jacqueline de Oliveira

Avaliação de propriedades físicas, mecânicas e biológicas de uma resina acrílica para base de próteses após imersão em soluções de sabonetes líquidos desinfetantes: efeito de tempo de imersão / Jacqueline de Oliveira Zoccolotti.-- Araraquara: [s.n.], 2017
87 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

1. Resinas acrílicas 2. Prótese dentária 3. Desinfetantes
4. Biofilmes 5. Técnicas de cultura de células I. Título

JACQUELINE DE OLIVEIRA ZOCCOLOTTI

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS, MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UMA RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESES APÓS IMERSÃO EM SOLUÇÕES DE SABONETES LÍQUIDOS DESINFETANTES: EFEITO DE TEMPO DE IMERSÃO.

Comissão julgadora

Defesa para obtenção do grau de Mestre

Presidente e orientadora: Profa. Dra. JANAINA HABIB JORGE

2º examinador: Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS MOLLO JUNIOR

3º examinador: Profa. Dra. NARA HELLEN CAMPANHA

Araraquara, 16 de Março de 2017.

DADOS CURRICULARES

JACQUELINE DE OLIVEIRA ZOCCOLOTTI

NASCIMENTO: 09 de Janeiro de 1989

FILIAÇÃO: Roberto Sidnei Zoccolotti

Silvia Maria de Oliveira Zoccolotti

2010-2014: Curso de Graduação na pela Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2013-2014: Estágio de iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2015-2017: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2015: Estagio de Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível I, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2016: Estagio de Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvia Maria de Oliveira Zoccolotti e Roberto Sidnei Zoccolotti, que com muito amor sempre me apoiaram, incentivaram, e não mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui.

E também a minha orientadora, Janaina Habib Jorge, pela dedicação e confiança em mim depositadas, representadas pela sua amizade e disposição a qualquer momento. Eu posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem você.

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado durante esses dois anos, vocês me deram apoio e suporte para que eu pudesse concluir esse trabalho:

Aos meus amigos e parceiros de pós-graduação, ao pessoal do laboratório e funcionários da faculdade, aos professores do departamento, a minha irmã Camila, a minhas amigas de vida - Bebel, Marcela, Laisi, Camila, Julia, Juliana, Suelen, Bruna, Gabriela, Bianca, Marina e Rafaella, a minhas amigas e parceiras de trabalho que me ajudaram na realização desta pesquisa - Maria Izabel, Camilla e Isadora, e a quem mais conviveu comigo neste último ano, e que esteve ao meu lado me apoiando e incentivando com muita paciência e carinho: Diego.

"Obrigada por tudo, à realização desse sonho é o resultado da confiança e da força de cada um de vocês."

Zoccolotti JO. Avaliação de propriedades físicas, mecânicas e biológicas de uma resina acrílica para base de próteses após imersão em soluções de sabonetes líquidos desinfetantes: efeito de tempo de imersão. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia UNESP; 2017.

RESUMO

A desinfecção química associada ao método mecânico tem sido recomendada para a higienização de próteses removíveis parciais ou totais. Levando-se em consideração as desvantagens dos agentes químicos de limpeza utilizados para a desinfecção ou redução do biofilme das próteses, como o manchamento, branqueamento e corrosão das partes metálicas, novos estudos são necessários. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas, físicas e mecânicas de uma resina acrílica para base de próteses após imersão em sabonetes líquidos desinfetantes, nas suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) para *Candida albicans*, após diferentes períodos de tempo. Primeiramente, a CIM de cada sabonete foi determinada. Amostras de resina acrílica (Vipi Wave®) foram confeccionadas e divididas em grupos para avaliação da capacidade de formação de biofilme (n=6), citotoxicidade (n=9), rugosidade (n=15), dureza (n=15) e alteração de cor (n=15), após imersão por 0, 7, 14, 21 e 28 dias, nas seguintes soluções: AD: imersão em água destilada a 37°C (grupo controle); SD: ciclos de imersão diária em sabonete Dettol® a 0,39%, por 8 horas a temperatura ambiente, seguido de imersão em água destilada por 16 horas a 37°C, simulando a desinfecção noturna das próteses; SP: ciclos de imersão diária em sabonete Protex® a 3,12%, conforme descrito para o grupo anterior. SL: ciclos de imersão diária em sabonete Lifebuoy® a 0,78%, conforme descrito para o grupo SD. Além disso, a redução do biofilme de *Candida albicans* formado sobre a superfície de amostras (n=9) imersas por 8 horas (overnight) nas soluções também foi avaliada. Para análise da capacidade de formação de biofilme, realizaram-se os testes de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e o alamarBlue® após a fase de adesão e após 24 horas de formação do biofilme. Os resultados foram submetidos ao teste de ANOVA ($\alpha = 0,05$). Para a fase de adesão, os resultados mostraram que o tipo de sabonete teve um efeito estatisticamente significativo na capacidade da formação do biofilme, mas após 24 horas, tanto para a contagem de UFC quanto para o teste alamarBlue®, nenhuma diferença foi encontrada entre as soluções ou entre os tempos de armazenamento. Para saber a eficácia na redução de biofilme após imersão por 8 horas nas soluções desinfetantes, avaliou-se o remanescente do

biofilme de 48 horas também por meio da contagem de UFC. Para a análise estatística, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn ($\alpha = 0,05$). A análise mostrou uma diferença significativa ($p=0.014$) quando os grupos foram comparados entre si. O grupo imerso em sabonete Protex® apresentou uma pequena redução do biofilme em comparação com o grupo controle; já os grupos imersos em sabonete Dettol® e Lifebuoy® eliminaram totalmente o biofilme existente nas superfícies das resinas acrílicas. Os resultados do teste de citotoxicidade foram avaliados qualitativamente (comparação com o grupo controle) e quantitativamente (ANOVA two-way seguido do teste post-hoc de Bonferroni). Na análise qualitativa observou-se que todos os sabonetes foram classificados como não citotóxicos, pois apresentaram inibição menor que 25% em relação ao grupo controle, independentemente do tempo de armazenamento. Os resultados da análise quantitativa demonstraram que não houve diferença quanto à viabilidade celular para os diferentes grupos, mas que, após 21 dias, houve diminuição da viabilidade celular em decorrência do tempo prolongado de imersão, independentemente do tipo de sabonete. ANOVA two-way e teste post-hoc de Bonferroni e LSD foram usados para análise dos resultados dos testes de propriedades mecânicas e física ($\alpha=0.05$). Nos valores de rugosidade não existiu diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos avaliados. O sabonete Lifebuoy® diminuiu os valores de dureza da resina, independentemente do tempo de armazenamento ($p=0,003$). Após 21 e 28 dias de armazenamento, houve um aumento dos valores de dureza, independentemente do tipo de sabonete utilizado. Os valores de unidades de NBS (National Bureau of Standards) ficaram entre 0,27 e 0,58 indicando alterações de cor imperceptíveis ou leves para todos os grupos, porém na análise quantitativa o sabonete Lifebuoy® produziu maior efeito na alteração de cor independentemente do tempo de armazenamento, e independente do tipo de sabonete houve um aumento da alteração da cor de acordo com o maior tempo de imersão. Concluiu-se que, de maneira geral, as soluções dos sabonetes desinfetantes não foram capazes de inibir o crescimento do biofilme, porém todos os sabonetes testados foram eficazes na redução do biofilme formado sobre a resina acrílica para bases de próteses. Todos os grupos foram classificados como não citotóxicos e não houve alteração dos valores de rugosidade para nenhum deles. Porém o sabonete Lifebuoy® alterou os valores de dureza e cor da resina acrílica, independente do tempo de armazenamento.

Palavras Chaves: Resinas acrílicas. Prótese dentária. Desinfetantes. Biofilmes. Técnicas de cultura de células.

Zoccolotti JO. Evaluation of physical, mechanical and biological properties of a denture base acrylic resin after immersion in liquid soaps solutions disinfectants: effect of storage time. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia UNESP; 2017.

Abstract

Chemical disinfection associated with the mechanical method has been recommended for the cleaning of partial or full dentures. Taking into consideration the drawbacks of the cleaning chemicals used for disinfection or reduction of biofilm of prostheses, such as staining, bleaching and corrosion of metal parts, further studies are needed. The objective of this study was to evaluate the biological, physical and mechanical properties of an acrylic resin for denture base (Vipi Wave®) after immersion in liquid disinfectant soaps in their minimum inhibitory concentrations (MIC) for *Candida albicans*, after different periods of time. Samples of acrylic resin (Vipi Wave®) were made. Samples from acrylic resin (Vipi Wave®) were made and shared in groups for the assessment of the biofilm formation capacity (n=6), cytotoxicity (n=9), roughness (n=15), hardness (n=15) and color change (n=15) after immersion in the following solutions for 0, 7, 14, 21 and 28 days: AD: immersion in distilled water at 37 ° C (control group); SD: daily immersion cycles in soap Dettol® 0.39% for 8 hours at room temperature, followed by soaking in distilled water for 16 hours at 37 ° C, simulating the night disinfection of prostheses; SP: daily immersion cycles in soap Protex® to 3.12%, as described for the previous group. SL: daily immersion cycles in Lifebuoy® in soap to 0.78%, as described for the SD group. In soap Dettol® was found the MIC of 0.39% of the soap concentration; in Protex® 3.12% and in Lifebuoy® the MIC was 0.78%. In addition, capacity of reduction of the biofilm of *Candida albicans* formed on the surface of samples (n = 9) immersed for 8 hours (overnight) in the solutions was also evaluated. To know the biofilm-forming capacity, there were the forming unit count tests of colonies and alamarBlue® after accession and after 24 hours of biofilm formation. The results were submitted to ANOVA ($\alpha = 0.05$). For the adhesion layer, the results showed that the type of soap had a statistically significant effect on the ability of biofilm formation, but after 24 hours, both methods counting colony forming units and the alamarBlue® test, had resulted in no differences was between solutions or between storage times. For effectiveness in reducing biofilm after soaking for 8 hours in disinfectant solutions, it was evaluated the remaining biofilm by counting colony forming units. For statistical analysis, it was used the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn ($\alpha = 0.05$). The analysis showed a significant difference ($p =$

0.014) when the groups were compared amongst themselves. The immersed group, Protex® soap showed a small reduction in the biofilm compared to the control group, while the groups immersed in soap Dettol® and Lifebuoy® totally eliminated the existing biofilm on the surfaces of acrylic resins. The results of the cytotoxicity assay were qualitatively assessed (compared with the control group) and quantitatively (two-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni). In qualitative analysis, it was observed that all the soaps were classified as non-cytotoxic, because they showed less than 25% of inhibition in relation to the control group, regardless of storage time. The results of quantitative analysis showed no difference in cell viability for different groups, but after 21 days, there was a decrease in cell viability as a result of prolonged immersion, regardless of the type of soap. ANOVA two-way and physical and post-hoc Bonferroni and LSD were used for analysis of the results of mechanical properties testing ($\alpha = 0.05$). In the roughness values there was no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the groups. The Lifebuoy® soap decreased resin hardness values, regardless of the storage time ($p = 0.003$). After 21 and 28 days of storage, there was an increase of hardness values, regardless of the type of soap used. The values of NBS units (National Bureau of Standards) were between 0.27 and 0.58 indicating unnoticeable or light color changes for all groups, but in the quantitative analysis of the Lifebuoy® soap was produced greater effect on color change regardless of time storage, regardless of the type of soap there was an increase in color change according to the longer duration of immersion. In conclusion, generally, solutions of disinfectant soaps were not able to inhibit biofilm growth, but all tested soaps are effective at reducing the biofilm formed on the acrylic resin for denture bases. All groups were classified as non-cytotoxic and there was no change of roughness values for any group, but Lifebuoy® soap changed the hardness and color values of acrylic resin, regardless of the storage time.

Key Words: Acrylic resin. Prosthesis. Disinfectant. Biofilms. Cell culture techniques.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3 PROPOSIÇÃO.....	28
4 MATERIAL E MÉTODO.....	29
4.1 Material de Consumo.....	29
4.2 Instrumentais.....	30
4.3 Equipamentos.....	31
4.4 Metodologia.....	32
4.4.1 Preparo da Mufla.....	32
4.4.2 Confeção do Corpo de Prova.....	34
4.4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	36
4.4.4 Sabonetes Desinfetantes Utilizados.....	39
4.4.5 Medidas de ph.....	39
4.4.6 Grupos Experimentais.....	40
4.4.7 Capacidade de Formação de Biofilme.....	40
4.4.8 Capacidade de Redução de Biofilme.....	43
4.4.9 Citotoxicidade.....	45
4.4.10 Rugosidade.....	47
4.4.11 Dureza.....	47
4.4.12 Alteração de cor.....	47
4.4.13 Análise dos resultados.....	48
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Determinação dos MIC's.....	51
5.2 Capacidade de formação de biofilme.....	52
5.3 Capacidade de redução de biofilme.....	56
5.4 Citotoxicidade.....	58
5.5 Rugosidade.....	60
5.6 Dureza.....	61
5.7 Alteração de cor.....	63
6 DISCUSSÃO.....	68
7 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética é a condição inflamatória eritematosa encontrada com maior frequência nos pacientes portadores de próteses removíveis parciais ou totais. A etiologia da estomatite protética mostra-se extremamente variável, sendo considerada multifatorial. Biofilme microbiano, trauma, uso contínuo da prótese e xerostomia constituem fatores predominantes na patologia desta alteração (Dorocka-Bobkowska et al.²¹, 1996; Budtz-Jorgensen¹¹, 2000; Feltrin et al.²⁶, 1993; Webb et al.^{92, 93, 94}, 1998). A adesão de mico-organismos, principalmente as espécies de *Candida*, na superfície interna das bases das próteses ou materiais reembasadores, é considerada fator primordial para o aparecimento da estomatite protética. As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos a determinadas superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sendo assim, os cuidados de higiene são aspectos importantes na manutenção da saúde bucal dos usuários de próteses removíveis parciais ou totais (Radford et al.⁷⁴, 1998; Morgan, Wilson⁶², 2001).

Diversos são os tratamentos propostos para a estomatite protética. O tratamento mais comumente recomendado tem sido a utilização de medicamentos antifúngicos, os quais podem ser de aplicação tópica ou sistêmica, orientação do paciente quanto à higienização da prótese e verificação da necessidade da troca da mesma. Além disso, é consenso na literatura que a suspensão do uso da prótese favorece a diminuição do componente inflamatório. Porém, o uso de drogas antifúngicas é limitado por inúmeros fatores, como resistência fúngica, baixa solubilidade e alta toxicidade.

Sendo assim, a prevenção é considerada a medida mais eficaz a ser assumida contra os problemas relacionados ao uso de próteses removíveis. Dentre os métodos de prevenção, a limpeza das próteses é fator essencial. A higienização pode ser realizada mecanicamente, quimicamente ou pela combinação de ambas (Nikawa et al.⁶⁸, 1999).

Os procedimentos mecânicos compreendem a escovação e a utilização de vibradores sônicos ou ultrassônicos. O procedimento mecânico de remoção do biofilme nas superfícies das próteses mais utilizado pelos pacientes é a escovação com sabão ou dentífrico (Radford et al.⁷⁴, 1998). A remoção efetiva do biofilme pelo método da escovação é considerada duvidosa, uma vez que as superfícies das bases das próteses são irregulares e porosas. Além disso, apesar da escovação ser o método mais amplamente utilizado, pacientes com coordenação motora comprometida tem dificuldade em realizar esse procedimento de forma adequada (Nikawa et al.⁶⁸, 1999 ; Kulak-Ozkan et al.⁴⁴, 2002).

Dessa forma, a limpeza química, como a imersão das próteses em soluções desinfetantes, deveria também ser realizada (Moffa et al.⁵⁹, 2011). Estratégias de desinfecção por soluções químicas têm sido freqüentemente recomendadas devido a sua efetividade em inibir ou eliminar diferentes micro-organismos (Altieri et al.³, 2013).

Vários são os agentes químicos de limpeza utilizados para a desinfecção ou redução do biofilme das próteses, como hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina e álcool (Bell et al.⁸, 1989; da Silva et al.¹⁶, 2008; Smith, Hunter⁸⁵, 2008). O hipoclorito de sódio pode ser útil para a desinfecção das próteses, uma vez que inativa o biofilme bacteriano e inibe a formação de cálculo (da Silva et al.¹⁶, 2008; BudtzJørgensen et al.¹³, 1979). Já o gluconato de clorexidina, além de inativar o biofilme, reduz a capacidade de adesão dos micro-organismos, sendo considerado efetivo na desinfecção de próteses (McCourtie et al.⁵⁷, 1985).

Porém, estudos mostram algumas desvantagens em relação à utilização desses agentes desinfetantes. O glutaraldeído, apesar de possuir ação bactericida, não deve ser utilizado para a imersão de próteses, uma vez que pode ficar impregnado nas porosidades das resinas, resultando em efeito irritante aos tecidos bucais (Sagripanti, Bonifacino et al.⁷⁹, 2000). O hipoclorito de sódio pode causar efeitos citotóxicos moderados aos tecidos bucais, além de promover branqueamento das bases acrílicas e corrosão dos componentes metálicos das próteses (Molinari, Runnells⁶¹, 1991).

Outras desvantagens associadas à desinfecção por agentes químicos são redução da resistência à flexão após a imersão em álcool (Asad et al.⁵, 1993), baixa efetividade antimicrobiana dos iodóforos (Pavarina et al.⁷², 2003) e manchamento das bases das próteses pelo uso de soluções à base de clorexidina (Asad et al.⁵, 1993).

Atualmente, os sabonetes antissépticos têm sido muito utilizados com o objetivo de eliminar os micro-organismos de várias superfícies. A eficácia como agente antimicrobiano tem sido constantemente comprovada. Os sabonetes antissépticos são capazes de remover de 65% a 85% dos micro-organismos existentes na pele humana (Larson et al.⁴⁵, 2004; Farzana et al.²⁴, 2011).

Idealmente, um agente de limpeza químico deveria ser capaz de inativar os micro-organismos, ser biologicamente compatível e não deveria causar efeitos adversos sobre os materiais que compõem a prótese. Todavia, pode haver o branqueamento e/ou descoloração da resina acrílica após exposição prolongada em agentes químicos de desinfecção (Sepúlveda-Navarro et al.⁸², 2011).

Levando-se em consideração as desvantagens dos agentes químicos de limpeza utilizados para a desinfecção ou redução do biofilme das próteses, julgou-se necessário avaliar as propriedades físicas, mecânicas e biológicas de uma resina acrílica para base de próteses após imersão em soluções de sabonetes líquidos. Além disso, o efeito do tempo de imersão também foi avaliado. Tal estudo é considerado importante, pois, além de tornar viável mais uma opção para a desinfecção de próteses parciais ou totais, não há relatos na literatura com este propósito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As espécies de *Candidas* podem causar dois principais tipos de infecções humanas: infecções superficiais, como candidose oral e vaginal, e infecções sistêmicas potencialmente fatais. A habilidade desse fungo infectar nichos tão diversos é devida a diversos fatores de virulência e atributos. O polimorfismo, nas formas de leveduras e hifas, é importante para a patogenicidade, pois enquanto as leveduras são importantes na disseminação da doença, as hifas invadem os tecidos (Iacopino et al.³⁵, 1992). Um fator de virulência importante desse micro-organismo é a capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas (próteses) e biológicas (mucosa). Os biofilmes são o modo mais comum de crescimento bacteriano na natureza (Chandra et al.¹⁵, 2001), formando-se um nicho protetor para micro-organismos, podendo criar uma fonte de infecção persistente. De acordo com Rodney e Costerton⁷⁷ (2002) os biofilmes foram descritos pela primeira vez por Antonie van Leeuwenhoek no período compreendido entre 1670 a 1680, e o processo de formação de biofilme não foi discutido até 1978. Agora se entende que biofilmes são universais ocorrendo em vários tipos de sistemas, e tem grande importância para a saúde pública. São caracterizados por uma comunidade sésil por células que formam microcolônias, que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, interface, ou a uma matriz extracelular. A formação do biofilme é um processo sequencial que inclui a aderência de leveduras no substrato, a proliferação dessas células, a formação de hifas, acúmulo de matriz extracelular e, finalmente, a dispersão das leveduras do complexo. Biofilmes maduros são muito mais resistentes a agentes antimicrobianos e a resposta imune do hospedeiro que células planctônicas. A dispersão das leveduras do complexo do biofilme contribui diretamente para a virulência. Após a adesão das células ao hospedeiro e a formação de hifas, *Candida ssp* podem secretar hidrolases, as quais provavelmente facilitam a penetração nas células do hospedeiro. *Candida albicans* são patógenos oportunistas que são frequentemente isoladas da cavidade oral (Mayer et al.⁵⁶, 2013)., e seus biofilmes são frequentemente associados com a candidíase (Gomes et al.³⁰, 2011). Compreender os mecanismos de patogenicidade que a *Candida albicans* usa durante a infecção é fundamental para desenvolver terapias antifúngicas e diagnósticos. Na cavidade oral, a fase inicial da candidose ocorre com a adesão de *Candida ssp* nas células epiteliais da mucosa oral, e então há o crescimento e invasão aos tecidos. Porém, os mecanismos envolvidos na produção dos fatores de virulência são complexo e podem variar de acordo com o local, a fase de invasão e a natureza imunológica do hospedeiro (Nikawa et al.⁶⁸, 1999). Existem algumas formas da adesão de *Candida albicans* à superfície da mucosa, tais como forças de van der Waals, as

forças de Londin e interações hidrófobas. Outra maneira é a congregação de leveduras com bactérias orais, que podem criar um ambiente ácido, facilitando a proliferação da *Candida albicans*. Além disso, existe maior facilidade da *Candida albicans* em aderir-se em poliestireno na presença de *Streptococcus*, podendo assim correlacionar-se com a sua adesão em resina acrílica Kulak et al.⁴³ (1997). As espécies de *Cândida albicans* são as leveduras mais frequentemente encontradas na cavidade oral, essa espécie de micro-organismo costuma viver em relação de comensalismo com os seres humanos, estando presente na cavidade oral de 75% da população (Webb et al.⁹², 1998), contudo são também as espécies mais comumente envolvidas nas infecções humanas (Williams, Lewis⁹⁷, 2011).

A habilidade de aderência de *Candida albicans* em superfícies é um pré-requisito para o seu sucesso como comensal e persiste durante a infecção (Abe et al.¹, 2006). A formação de biofilmes é outro mecanismo que aumenta a resistência do micro-organismo, onde eles se agregam em comunidades envolvida por matriz extracelular sobre uma superfície (Barnabé et al.⁷, 2004; Bell et al.⁸, 1989). A formação desses biofilmes sobre as bases das próteses é um fator predisponente para a estomatite protética. A redução do micro-organismo na cavidade oral pode ser feita por meio de uma higiene oral adequada. Os antifúngicos ainda são limitados, mas os mais usados são a anfotericina B e a nistatina, que agem sobre a membrana da célula fúngica, sendo fungicidas. O uso desses antifúngicos é ainda mais limitado por sua baixa absorção pelo intestino, portanto sua forma de administração é tópica. Há ainda drogas fungistáticas de uso interno, como o fluconazol e o itraconazol. Contudo, essas drogas têm apresentado resistência microbiana, por isso necessita-se a busca de tratamentos alternativos.

Em uma revisão de literatura para avaliar as doenças bucais causadas por espécies de *Candida* (Webb et al.⁹², 1998), foi avaliado que certas condições sistêmicas e/ou defeitos no sistema imunológico podem predispor o hospedeiro à infecção por esse micro organismo, e a forma mais comum de candidoses orais está associada a estomatite protética. Recentemente tem havido controvérsias sobre a etiologia da doença. No passado, alguns investigadores associam a estomatite com infecções bacterianas ou trauma, outros descartam a possibilidade da *Candida albicans* estar presente na boca dos pacientes com a doença. Estudos atuais indicam que as lesões da estomatite protética estão associadas com a detecção de espécies de *Candida*, enquanto outros fatores tais como a higiene das próteses, traumatismo, doenças sistêmicas e deficiências do sistema imunológico também podem estar envolvidos. Assim, acredita-se que a causa da estomatite protética é multifatorial tendo sido considerado os

seguintes fatores: trauma, uso contínuo da prótese, falta de limpeza das próteses, fatores dietéticos, infecções por *Candida* e condições como predisposições sistêmicas.

Resinas acrílicas termopolimerizáveis são utilizadas em próteses dentárias devido sua boa estética e baixo custo. Existe uma alta incidência de estomatite induzida nos usuários de próteses (Arendorf, Walker⁴, 1987), e muitos estudos apontam a *Candida albicans* como o agente causador (Ramage et al.⁷⁵, 2012), segundo Lazarin et al.⁴⁶ (2014) uma das consequências do uso contínuo de prótese dentárias é a adesão desses micro-organismos e formação de biofilme (Abe et al.¹, 2006).

Segundo Morgan e Wilson⁶² (2001) a escolha do tipo apropriado de acrílico pode reduzir a formação do biofilme. A referida conclusão deu-se após os autores analisarem a adesão de *Streptococcus oralis* em superfícies acrílicas com diferentes rugosidades. O número de bactérias que aderem à superfície acrílica aumentou linearmente com a rugosidade superficial média após 2 horas de incubação. No entanto, após 4 horas de incubação, a rugosidade da superfície não pareceu ter qualquer efeito sobre o número de bactérias aderentes. E Radford et al.⁷⁴ (1998), também concluiu que a saliva é capaz de reduzir a aderência por *Candida* em toda a superfície da base de prótese, sendo a mesma lisa ou mais rugosa.

Portanto, temos alguns fatores que contribuem para o desenvolvimento desse micro-organismo, são eles: idade da prótese, fluxo salivar, e material da base de prótese. Como a adesão de *Candida albicans* a superfície das bases de dentaduras é agora reconhecida como uma fase importante na sua colonização e patogênese, inibir esse processo de adesão precoce seria uma medida significativa na prevenção da estomatite protética (Yoshijima et al.⁹⁸, 2010).

De acordo com Zissis et al.⁹⁹ (2006), as próteses removíveis parciais ou totais podem acumular biofilme, acarretando na formação de cálculo, semelhante à dentição natural. A falta de limpeza adequada pode favorecer esse acúmulo de biofilme na prótese e isso está associado com o aumento da incidência de estomatite protética. O aumento na rugosidade de superfície também pode promover facilmente a adesão fúngica.

A higienização deficiente das próteses também pode favorecer o desenvolvimento da candidose. A limpeza mecânica é um meio eficaz, mas muitos dos pacientes apresentam dificuldades em manter suas próteses limpas. Assim, o uso de agentes químicos é recomendado (Budtz-Jorgensen¹², 1981). O acúmulo de placa microbiana nas próteses é prejudicial tanto para a mucosa oral quanto para a saúde geral do paciente. Por isso, o

cirurgião dentista deve informar e instruir os pacientes sobre os materiais e os métodos de higienização, assim como é fundamental que os pacientes realizem a higienização adequadamente (Budtz-Jørgensen¹³, 1979).

Molinari e Runnells⁶¹ (1991) relatam que muitos produtos comerciais são eficientes na odontologia como desinfetantes e esterilizantes, embora, alguns dos produtos atuem apenas como desinfetantes e não esterilizam, outros possuem um odor que é desagradável, mancham ou provocam branqueamento e algumas das formulações são corrosivas para as superfícies metálicas. As informações sobre o produto devem ser consideradas anteriormente a decisão por um produto químico esterilizante ou um desinfetante de superfície para uso de rotina.

Em 2008, o grupo Food and Drug Administration⁸⁶ emitiu uma exigência para os fabricantes de agentes higienizadores de prótese, considerando alternativas para os tipos de ingredientes nesta classe de produtos. Essa ação foi em resposta à 73 reações graves, incluindo pelo menos uma morte, ligada a esses agentes químicos. O persulfato encontrado na maioria desses produtos, por exemplo, é conhecido por causar reações alérgicas. Alguns dos sintomas conhecidos são irritação e danos aos tecidos, erupção cutânea, urticária, problemas respiratórios, pressão e frequência sanguínea baixas. Outros sintomas relacionados com a utilização indevida dos agentes higienizadores de próteses podem incluir danos no esôfago, dor abdominal, queimaduras, problemas respiratórios, convulsões, sangramento interno e vômitos.

Embora existam grande variedades de métodos e agentes de desinfecção para próteses, muitos estudos têm mostrado que menos de 60% dos usuários de próteses usam os produtos químicos, e entre os que utilizam, tem preferência por produtos caseiros, pois são mais fáceis de manejar e possuem um preço mais acessível (Veres et al.⁸⁹, 1985).

Além de prevenir e controlar as infecções orais, os métodos de desinfecção são necessários para prevenir a infecção cruzada (Asad et al.⁵, 1993) relataram a necessidade de controle de infecção cruzada em clínicas e laboratórios dentais, pela preocupação com doenças transmissíveis, como a hepatite B. Os micro-organismos podem ser transmitidos diretamente com o contato com sangue ou saliva de uma pessoa infectada, ou indiretamente por moldes e próteses dentárias. São recomendados agentes químicos para a desinfecção, já que as próteses não podem ser levadas à altas temperaturas para desinfetar ou esterilizar.

As características ideais de um agente para limpeza de próteses devem incluir: capacidade de remoção do biofilme e de manchas e ser antibacteriano e antifúngico para

reduzir o nível de biofilme de patógenos potencialmente nocivos. Além disso, deve ser não tóxico, ser compatível com os materiais de prótese e não modificar ou degradar a superfície da resina acrílica da base de prótese ou dos dentes artificiais. Precisa agir em um período curto (\leq 8 horas), ser fácil de usar para o paciente ou cuidador e ter baixo custo (Abelson², 1985; Nikawa et al.⁶⁸, 1999).

Para a desinfecção de próteses dentárias removíveis tem sido recomendado vários agentes, como hipoclorito de sódio, clorexidina, dióxido de cloro, glutaraldeído e álcoois. As próteses removíveis podem ser expostas por muitas vezes às soluções de desinfecção durante o período de vida útil e isso pode afetar as propriedades físicas e mecânicas das resinas de base (Asad et al.⁵, 1993). Estudos sobre essas propriedades como resistência à flexão, microdureza, morfologia da superfície e alteração de cor das resinas têm mostrado que há alguns efeitos adversos como por exemplo a descoloração.

Felton et al.²⁵ (2011) publicaram uma revisão de literatura usando, nas bases de dados, as palavras chaves "dentaduras completas," "edentulismo", e várias outras combinações desses termos. Além disso, também foram pesquisados artigos com palavras chaves como: "biofilme", "adesivos", "produtos de limpeza", "limpeza", "bases", "reparos", "estomatite" e "manutenção". Os resumos revisados foram: revisões Cochrane, revisões sistemáticas, revisões gerais de literatura, metanálises, ensaios clínicos randomizados, ensaios clínicos prospectivos, estudos transversais, estudos de coorte retrospectivo e qualquer estudo in vitro que introduziram novas abordagens para a avaliação do tema. Mais de 300 resumos foram revistos e, ao definir-se os critérios de inclusão e exclusão, permitiu-se a identificação de 120 artigos, que foram revisadas pelos membros do American College of Prosthodontists. Após a revisão, os membros do grupo de pesquisa realizaram uma análise cuidadosa de todos os artigos e eles forneceram os resumos para todo o grupo, e uma reunião foi realizada na Escola de Odontologia da Universidade da Carolina do Norte em maio de 2010 para estabelecer as diretrizes. Após a reunião foi desenvolvido um documento fornecendo diretrizes baseadas em evidências para o cuidado e manutenção de dentaduras completas. Foram elaboradas 15 diretrizes para a boa higienização, armazenamento e manutenção das próteses totais, como por exemplo a diretriz de que o usuário deve fazer a remoção diária cuidadosa do biofilme bacteriano presente na cavidade oral e nas próteses, sendo isso de suma importância para minimizar estomatite protética e para ajudar a contribuir para uma boa saúde bucal e geral.

Alguns estudos relataram o efeito de procedimentos de desinfecção sobre a remoção do biofilme e/ou tratamento da estomatite protético.

Segundo McCourtie et al.⁵⁷ (1985) a clorexidina 2%, causa a inibição da adesão de espécies de *Cândida* nas próteses dentárias por até 19 dias após a limpeza com o agente desinfetante. O estudo foi realizado, utilizando-se de amostras de resina acrílica, para a observação de redução da adesão de cinco espécies de *Cândida*, após o pré-tratamento destas amostras, com saliva, soro e clorexidina. No grupo de tiras pré-tratadas com soro observou-se uma adesão de leveduras de *Cândida* ligeiramente maior do que no grupo de amostras tratadas com saliva. O grupo de amostras tratadas com clorexidina 2% revelou a redução da adesão de espécies de *Cândida* entre 19% a 86%.

Outro autores (Mahonen et al.⁵⁴, 1998) avaliaram a eficácia de imersão da prótese em uma solução química desinfetante de glutaraldeído 2%, sobre alguns níveis dos microorganismos salivares, e em alguns parâmetros salivares como pH e capacidade tampão. Além disso avaliaram a prevalência de candidose e a influência da prótese após a imersão. Para esse estudo foram selecionados quarenta e três pacientes parcialmente desdentados, tratados na Universidade de Oulu. Os pacientes foram aconselhados a escovar normalmente suas próteses como já faziam, e durante um período de 4 semanas, imergirem suas próteses durante a noite, de forma aleatória, quer numa solução desinfetante (Grupo 1) ou em uma solução placebo (Grupo 2), e antes de coloca-las na cavidade oral, lava-las bem em água corrente, para evitar qualquer possível influência da solução na mucosa. Observou-se diminuição de microbiotas salivares, concluindo-se que a desinfecção pode melhorar a defesa salivar (capacidade tampão). Observou-se também redução da colonização *Candida albicans* sob as próteses. Porém, somente a desinfecção não foi recomendada como único tratamento, e sim como agente profilático, sendo necessário para pacientes usuários de próteses.

Comparando artigos relacionados a eficácia de produtos de limpeza de prótese dentárias, Nikawa et al.⁶⁸ (1999) observaram que os resultados obtidos variam consideravelmente, salientando também que os produtos químicos de limpeza não são tão eficazes em uso clínico como no ensaio in vitro. A incerteza sobre a eficácia pode ser causada por metodologia despadronizada e relatórios com resultados conflitantes. Os autores relatam a importância da análise ser feita na totalidade da superfície da prótese e não somente em uma delimitação da mesma, utilizando-se também de uma metodologia que torne possível qualificar e quantificar o biofilme.

Em 2002, Kulak-Ozkan et al.⁴⁴, estudaram os hábitos de higiene oral, limpeza de prótese, presença de leveduras e estomatite protética em pessoas idosas. Setenta usuários de próteses totais foram investigados clinicamente e micologicamente. Os indivíduos foram

avaliados de acordo com, presença de estomatite protética, presença de leveduras, limpeza da prótese, frequência na escovação e métodos de limpeza da prótese. Foram coletadas amostras do palato, para a identificação das colônias de levedura. Nenhuma relação estatística foi encontrada entre estomatite protética e frequência na escovação e métodos de limpeza da prótese. No entanto, houve uma relação estatisticamente significativa entre estomatite protética, a presença de leveduras e limpeza da prótese. Eles determinaram que o tratamento de candidose oral com antifúngicos tópicos, tais como nistatina e anfotericina B é eficaz inicialmente. No entanto, a medicação pode produzir efeitos secundários em alguns pacientes e, quando a terapia é interrompida a condição pode reaparecer. O tratamento alternativo que envolve a utilização de antissépticos e agentes de desinfecção, os quais desempenham um papel importante no controle da placa dental. O uso de hipoclorito de sódio para imersão da prótese total e removível, no período noturno (enquanto o indivíduo não a utiliza) resultou na eliminação do biofilme. Ainda segundo os autores, investigações recentes demonstraram que a irradiação de micro-ondas, em determinada configuração e tempo de exposição, é um potencial bactericida.

Pavarina et al.⁷², em 2003, avaliou um protocolo de controle de infecção na efetividade da imersão em soluções para reduzir o crescimento microbiano em próteses removíveis. Sessenta e quatro próteses foram esfregadas com cotonete estéril imediatamente depois de terem sido removidas da boca dos pacientes. As amostras foram colocadas individualmente no meio de cultura e incubadas imediatamente. As próteses foram lavadas durante 1 minuto em clorexidina a 4% e enxaguadas durante 1 min em água estéril e depois colocadas durante 10 minutos em um dos seguintes procedimentos de imersão: gluconato de clorexidina a 4%, hipoclorito de sódio a 1%, biocida (iodoforos) e amosan (peróxido alcalino). Depois dos procedimentos de desinfecção, as próteses foram imersas em água estéril durante 3 min e as amostras foram incubadas. Os resultados da cultura inicial revelaram que todas as próteses foram positivas para o crescimento de colônias. Quando comparadas com a cultura inicial, todas as soluções de imersão reduziram o crescimento dos micro-organismos, exceto o biocida, o qual não foi tão eficaz quanto as outras soluções que inativaram os micro-organismos. Todas as próteses inferiores (grupo sem sonicação) imersas no biocida mostraram um crescimento positivo. Já as próteses superiores (grupo com sonicação) foram positivas para o crescimento em seis das oito próteses. Portanto, próteses proporcionam uma fonte de contaminação cruzada entre pacientes e dentista. A imersão de uma prótese em solução desinfetante procura a descontaminação da mesma. Sempre que uma nova prótese for

entregue ao paciente, a mesma deve ser desinfetada. Dentro das limitações deste estudo, concluiu-se que o procedimento de lavar a prótese com 4 % de clorexidina associado com imersão em três das soluções avaliadas (Amosan, gluconato de clorexidina a 4% ou de hipoclorito de sódio a 1 %) pode ser eficaz na redução do crescimento microbiano. O número negativo de culturas após as próteses passarem pelo protocolo é um indicativo de desinfecção. O protocolo avaliado neste estudo mostrou um procedimento de controle de infecção para ser usado na prevenção da infecção de dentistas e da contaminação cruzada de outros pacientes.

Barnabé et al.⁷ (2004) em seu estudo comparam o efeito da desinfecção mecânica e desinfecção química associada no tratamento de candidose. Para isso utilizaram dois grupos de 30 usuários de próteses totais em tratamento de candidose. Os pacientes do primeiro grupo foram instruídos a escovar as próteses com sabão de coco seguido pela imersão em uma solução de água filtrada (200 mL), e água destilada (10 mL) (usada como a solução placebo), durante 10 minutos. Os pacientes do grupo 2 receberam instruções para escovar suas próteses com sabão de coco, seguido por imersão em uma solução de água filtrada (200 mL) e 1% hipoclorito de sódio (10 mL), durante 10 min. Os pacientes foram instruídos para limpar as próteses uma vez por dia. Todos os exames clínicos e os dados coletados foram realizados por um único examinador, 15 dias antes e após o início do tratamento. O hipoclorito de sódio é um dos desinfetantes mais antigos e mais utilizados. Pode ser um agente bactericida e fungicida, porque atua diretamente sobre a matriz orgânica da placa, e assim na dissolução da estrutura do polímero, provavelmente por causa da oxidação do componente proteico, reduzindo significativamente a adesão de mais *Candida albicans* às células epiteliais bucais. Estas características permitem que o hipoclorito reduza a habilidade adesiva da *Candida albicans*, mas ele não funciona como uma barreira anti-invasão, uma vez que não é capaz de evitar a produção de proteases pelos micro-organismos. A melhora clínica foi observada, mas não houve redução significativa de *Candida albicans* em ambos os grupos, porém o grupo 2 teve melhora na patogenicidade do micro-organismo, confirmando então a necessidade de recomendar a desinfecção química aos usuários de próteses.

Da Silva et al.¹⁶, em 2008, também avaliou a eficácia de soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina a 2%, glutaraldeído a 2,5% e vinagre a 100%) na remoção de cinco espécies microbianas (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, ou *Bacillus subtilis*) sob amostras de resina acrílica para base de prótese. Além disso, as características topográficas da resina acrílica após a desinfecção foram avaliadas. Trezentos e cinqüenta espécimes de resina acrílica foram contaminados pelos

microrganismos acima citados e, posteriormente, foram imersos em desinfetantes por 10 minutos; o grupo controle não foi submetido a qualquer processo de desinfecção. E, em um estudo paralelo, com o objetivo de avaliar o efeito do desinfetante testado sobre a superfície da resina, 60 amostras foram analisadas num rugosímetro digital antes e depois de dez ciclos de 10 minutos de imersão nos desinfetantes. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído a 2%, e digluconato de clorexidina a 2% foram mais eficazes contra os microrganismos pesquisados, seguido de vinagre 100%, perborato de sódio a 3,8%, e as pastilhas de perborato de sódio. A rugosidade superficial das amostras foi maior após desinfecção com ciclos de perborato de sódio 3,8% ($p = 0,03$) e menor após os ciclos com digluconato de clorexidina a 2% ($p = 0,04$). Dentro das limitações deste experimento, pode-se concluir que hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído a 2%, clorexidina a 2%, vinagre 100% e perborato de sódio a 3,8% são alternativas válidas para a desinfecção de resina acrílica.

Altieri et al.³ (2013) estudaram a erradicação de uma espécie de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), o qual, pode crescer como biofilme estruturado em diferentes superfícies, incluindo mucosa bucal e superfícies de próteses. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de duas soluções desinfetantes e irradiação por microondas na desinfecção de corpos de prova acrílicos contaminados com biofilme de MRSA. Trinta e seis espécimes de resina acrílica foram fabricados, esterilizados e contaminados com MRSA (107 ufc/mL). Após a incubação (37 °C/48 h), os espécimes foram divididos em quatro grupos: não desinfetados (controle positivo); imersos em hipoclorito de sódio 1% por 10 min; imersos em gluconato de clorexidina 2% por 10 min e irradiados por microondas durante 3 min a 650 W. Segundo o estudo nenhuma evidência de formação de biofilme foi observada em todas as amostras desinfetadas. A desinfecção em hipoclorito de sódio 1%, gluconato de clorexidina 2% e irradiação em micro-ondas resultaram em 100% de redução do metabolismo do biofilme de MRSA.

Os métodos químicos e mecânicos de desinfecção podem causar alterações nas propriedades físicas e mecânicas das resinas acrílicas utilizadas na confecção de bases de próteses. Assim, estudos foram realizados com o objetivo de verificar essas alterações, como descrito a seguir:

Pavarina et al.⁷² (2003) objetivaram investigar o efeito de soluções desinfetantes sobre a dureza dos dentes de resina acrílica utilizados em próteses dentárias. Foram selecionadas duas marcas de dentes artificiais de resina acrílica e três soluções desinfetantes para a realização da pesquisa. Para cada marca 32 dentes artificiais idênticos a partir do

mesmo lote, foram usados. Medições da dureza foram efetuadas através do uso de dureza Vickers. Doze leituras foram registradas para cada amostra e o valor médio foi calculado, então os corpos de prova foram colocados num banho de água a 37°C durante 48 horas e a dureza foi novamente registrada. Em seguida, os corpos de prova foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, onde os grupos de 1 a 3 foram imersos em solução desinfetante (Gluconato de clorexidina a 4%, hipoclorito de sódio a 1%, e perborato de sódio a 3,78%), e o grupo 4 mantido em água durante o mesmo período. Medidas de dureza foram feitas após esses procedimentos. Após as análises constatou-se que não houve nenhuma diferença significativa encontrada nas amostras imersas nas soluções químicas de desinfecção, comparadas ao grupo controle. É possível que essa ausência de diferença se deve à ligação cruzada dos materiais. O agente de ligação cruzada confere duas propriedades úteis para as resinas, reduz a solubilidade a solventes orgânicos, e reduz a tendência de estresse. As resinas utilizadas na fabricação dos dentes artificiais são semelhantes aos utilizados na construção base da prótese.

Neppelenbroek et al.⁶⁶, em 2005, avaliaram a dureza de resinas acrílicas termopolimerizáveis após a desinfecção e imersão a longo prazo em água. Na seleção de um desinfetante para próteses dentárias, a compatibilidade entre o desinfetante e o tipo de material de base de prótese deve ser considerada para evitar efeitos adversos sobre a dureza da resina acrílica. Trinta e dois espécimes em forma de disco (13 mm de diâmetro e 8 mm de espessura) foram fabricados a partir de cada resina (Lucitone 550 e QC-20), polidos, armazenados em água a 37 graus C durante 48 horas, e submetidos a testes de dureza Vickers (VHN) antes de desinfecção. Os métodos de desinfecção incluíram lavagem com gluconato de clorexidina a 4%, durante 1 minuto e imersão durante 10 minutos em uma das soluções desinfectantes testados (n = 8) (perborato de sódio 3,78%, gluconato de clorexidina 4%, ou hipoclorito de sódio 1%), e imersão em água durante 3 minutos. Os procedimentos de desinfecção foram repetidos 4 vezes, e 12 medições de dureza foram feitas em cada amostra. Espécimes controle (não desinfetados) foram armazenados em água por 56 minutos. Testes de dureza (VHN) também foram realizados após 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento em água. A análise estatística dos dados foi realizada com análise de medidas repetidas 3-way de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey (alfa = 0,05). Os valores médios demonstraram uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na dureza após a desinfecção, independentemente de materiais e desinfetantes usados. No entanto, este efeito foi revertido após 15 dias de armazenamento em água. Ambos os materiais apresentaram um aumento contínuo ($P < 0,05$) em valores de dureza até 60 dias de armazenamento em água. Após esse período, nenhuma

alteração significativa foi observada. Dentro das limitações deste estudo *in vitro*, QC-20 e Lucitone 550 apresentaram valores de dureza significativamente mais baixos após a desinfecção, independentemente da solução desinfetante utilizada.

A dureza é uma importante propriedade relacionada à resistência à abrasão. Essa propriedade poderá diminuir devido a um “amacramento” químico pela água das soluções desinfetantes ou aumentar em função da polimerização adicional induzida. Uma possível explicação para a diminuição da dureza é que, a princípio, as moléculas de água, presentes nas soluções, quando são absorvidas pela resina, agem como plastificantes, resultando na clivagem de ligações e deterioração gradual em sua infra-estrutura (Smith, Hunter⁸⁵, 2008). Além disso, o teor de monômero residual presente no interior do material pode afetar adversamente as propriedades mecânicas da prótese, em função do efeito plastificante.

Machado et al.⁵², em 2009, também avaliaram a dureza e rugosidade superficial de resinas acrílicas para base de prótese e reembasamento após os procedimentos repetidos de desinfecção. O estudo avaliou o efeito de microondas e desinfecção química da dureza Vickers (VHN) e rugosidade superficial (Ra) de 2 resinas rígidas para reembasamento imediato (Kooliner, Duraliner II), e uma resina para base de prótese (Lucitone 550), para isso, amostras foram divididas em grupos de controle e experimentais (n = 8) e a dureza e a rugosidade foram mensuradas após: polimerização e imersão em água (37°C) durante 7 dias (controle), ou exposição repetida a desinfecção por imersão em perborato de sódio (50°C / 10 min) ou irradiação microondas (650 W / 6 min). Medidas de rugosidade da superfície (Ra) e dureza (kg / mm) foram analisadas usando ANOVA 3-way e pelo teste de Tukey (alfa = 0,05) e obteve-se como resultado que a irradiação por microondas e a desinfecção química aumentaram a dureza média de Kooliner e Duraliner II, ao passo que os valores de Lucitone 550 mantiveram-se inalterados. A desinfecção por imersão em perborato de sódio aumentou a rugosidade da superfície de Duraliner II e Kooliner, independentemente do número de ciclos. Para Lucitone 550, foi observado um aumento da rugosidade após 2 ciclos de desinfecção química. Dois ciclos de desinfecção em microondas aumentaram a rugosidade de ambas as resinas para reembasamento, ao passo que a desinfecção repetida em microondas aumentou a rugosidade do Duraliner II. A desinfecção por imersão em perborato de sódio ou irradiação em microondas não afetou adversamente a dureza de todos os materiais avaliados e o efeito dos dois métodos de desinfecção sobre a rugosidade variou entre os materiais.

Sepúlveda-Navarro et al.⁸² (2011) salientaram, após estudos sobre estabilidade de cor em materiais de prótese, que estas alterações podem resultar em insatisfação do paciente

e despesas adicionais para a substituição das mesmas. Neste estudo foram avaliados três materiais para base de próteses. Quarenta discos de cada resina foram preparados e armazenados em água destilada durante 24 horas a 37 ° C. Após esse tempo, a cor de todos os espécimes foi medida espectrofotometricamente. Em seguida, as amostras foram imersas em café, cola, vinho tinto ou água destilada. Após 15 dias os discos de resina foram avaliados, observando maior pigmentação pelo vinho tinto seguido por café e posteriormente por cola.

Moffa et al.⁵⁹ (2011) relatou que, a estabilidade da cor dos materiais dentários é uma variável a ser considerada diante da escolha de métodos de desinfecção, apesar da estabilidade de cor também sofrer influência do tempo, independentemente da desinfecção com produtos químicos. Os autores observaram em um estudo clínico, o efeito de desinfecção química com perborato de sódio ou clorexidina na estabilidade de cor da resina (Tokuyama Rebase II), após reembasamento de próteses totais. Após as medições de cores no tempo inicial, os pacientes foram divididos aleatoriamente em grupo controle, grupo perborato de sódio e grupo clorexidina. Os grupos sofreram escovação e desinfecção por 5 minutos, uma vez por dia, durante 6 meses. A alteração de cor foi observada em todos os grupos, mesmo no grupo controle, que somente sofreu escovação.

Izumida et al.³⁷, em 2014, realizaram um estudo com o objetivo de investigar o efeito de higienizadores de prótese e do tempo na rugosidade superficial e na formação de biofilme de *Candida albicans* sobre uma resina acrílica. Amostras de TokuyamaRebaseFast II foram preparados e divididos em 9 grupos (n=15). Grupos experimentais foram escovados com uma das seguintes soluções (30 ciclos por dia): água, perborato de sódio ou clorexidina. Os ciclos foram realizados uma vez por dia durante 365 dias. A rugosidade superficial foi avaliada aos 0, 7, 15, 30, 90, 180, 270, e 365 dias e a formação do biofilme foi medida após 365 dias. Não foram encontradas diferenças significativas entre o agente da escovação e a desinfecção química ou entre desinfecção química e o tempo de interação. A escovação com dentifício mostrou uma diminuição gradual da rugosidade da superfície. Para a formação de biofilme *C albicans*, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Os valores de rugosidade variaram de 0,31 a 0,69 µm para todos os grupos avaliados.

Panariello et al.⁷¹, em 2015, avaliou os efeitos da imersão a curto prazo e da escovação com diferentes higienizadores de prótese sobre a rugosidade, dureza e cor de dois tipos de resina acrílica (Lucitone 550 (L) e Tokuyama Rebase rápida II (T)). Um total de 316 amostras (10 x 2 mm) foram fabricadas. Os espécimes (n = 9) foram divididos em escovação ou grupos de imersão de acordo com os seguintes agentes: dentifício / água destilada (D),

hipoclorito de sódio a 1 % (NaOCl) , Corega Tabs (PB), gluconato de clorexidina 1% (CHX), e ácido peracético 0,2% (Ac). Escovação e imersão foram testadas de forma independente. Os ensaios foram realizados após 1, 3, 21, 45 e 90 ciclos de escovação ou imersão durante 10 segundos cada. Os dados foram avaliados estatisticamente através de medidas repetidas de ANOVA. O teste de Tukey (HSD) post-hoc foi utilizado para determinar as diferenças entre as médias. Para L não houve diferença estatisticamente significativa na rugosidade, exceto uma diminuição pela escovação com D. As amostras de T mostraram um efeito significativo sobre a rugosidade após 90 imersões com Ac. Os valores de dureza diminuíram para L quando os espécimes foram imersos ou escovados em NaOCl e Pb. A dureza de T diminuiu com o aumento das repetições (imersão ou escovação), independentemente do método de limpeza. Os valores de estabilidade de cor para a resina L apresentaram alteração de cor significativa após a escovação e imersão em Ac e Pb. A escovação com D apresentou uma maior incidência de mudança de cor. Para T não houve diferenças significativas entre os agentes de limpeza e repetições de imersão. A mudança de cor foi notada após três escovações com o Ac, Chx e D. A escovação com dentífrício diminuiu a rugosidade de L. Imersão ou escovação com NaOCl e Pb diminuíram a dureza de L. Para T, a dureza diminuiu com aumentos de imersões ou escovações. As mudanças de cor após a imersão ou escovação com agentes de limpeza foram clinicamente aceitáveis de acordo com a National Bureau of Standards para ambas as resinas.

Porém a toxicidade de alguns desses materiais de desinfecção prejudica tanto os indivíduos que as utilizam em casa quanto os profissionais da saúde que trabalham diariamente com estes agentes toxicológicos. Sagripanti e Bonifacino⁷⁹ (2000) avaliaram a citotoxicidade de sete substâncias utilizadas na formulação de desinfetantes líquidos químicos. Foi utilizado o método de contato direto com as células, e com testes quantitativos de medição, os autores classificaram os produtos após a análise estatística e sugeriram que os agentes líquidos de desinfecção podem ser classificados em três grupos principais de acordo com a sua toxicidade relativa, 1-leve (fenol, peróxido de hidrogênio, e formaldeído) ; 2- moderada (hipoclorito de sódio); e 3-severa toxicidade (glutaraldeído, ascorbato cúprico, e ácido peracético). Ainda segundo os autores, os dados apresentados neste estudo podem ajudar a definir o risco tóxico relativo de diferentes substâncias de desinfecção para os pacientes e para os profissionais de saúde na seleção de formulações microbicidas mais seguras.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas, mecânicas e física de uma resina acrílica para base de próteses (Vipi Wave®) após imersão em sabonetes líquidos desinfetantes, nas suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) para *Candida albicans*, em diferentes períodos de tempo.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a capacidade de formação de biofilme de uma resina acrílica para base de próteses após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em soluções desinfetantes;
2. Avaliar a citotoxicidade de uma resina acrílica para base de próteses após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em soluções desinfetantes;
3. Avaliar a rugosidade de uma resina acrílica para base de próteses após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em soluções desinfetantes;
4. Avaliar a dureza de uma resina acrílica para base de próteses após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em soluções desinfetantes;
5. Avaliar a alteração de cor de uma resina acrílica para base de próteses após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em soluções desinfetantes;
6. Avaliar a capacidade de redução de biofilme formado sobre uma resina acrílica para base de próteses após 8 horas de imersão em soluções desinfetantes.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização da fase experimental do presente estudo, foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentais e equipamentos:

4.1 Materiais de Consumo

1. Água Destilada, Laboratório de Microbiologia - 4º andar – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara, São Paulo.
2. alamarBlue®, Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Waltham, Massachusetts, USA.
3. Alça calibrada para inoculação de microrganismos 10µL – Estéril – KASVI, Equipar Equipos Laboratóriais e Hospitalares Ltda, Curitiba, Pr,
4. Alça de Drigalsky estéril, Equipar Equipos Laboratóriais e Hospitalares Ltda, Curitiba, Pr, Brasil.
5. Álcool 70%, Ciclo Forma Indústria Química Eireli, Serrana SP, Brasil.
6. Cel-lac®, Sswhite, Rio de Janeiro,RJ - Brasil
7. Células HaCaT (0341) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
8. Cultura de *Candida albicans*, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA número (ATCC 90028):2327.
9. Cubeta descartável de 1,5 mL, Importador e distribuidor de produtos delaboratório Ltda, Curitiba, Pr, Brasil.
10. Folha de alumínio, Wyda Pratic, Sorocaba, São Paulo, Brasil.
11. Fosfato de Sódio Bi básico Anidro, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
12. Frasco coletor translúcido estéril 80 ml, Equipar Equipos Laboratóriais e Hospitalares Ltda, Curitiba, Pr,
13. Gesso pedra tipo III, cor amarela, Durastone, Uberaba, MG, Brasil.
14. Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
15. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (DAS), Difco ,Becton Dickinson and Company Sparks, MD 21152, EUA.
16. Meio de cultura RPMI-1640, Sigma-Aldrich, 3050 Spruce Street, St Louis, EUA.
17. Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB), HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. LBS Marg, Mumbai, India.

18. Microtubo de centrifugação transparente 1,5 mL, Kasvi, importado e distribuído por produtos para laboratório Ltda, Curitiba, PR, Brasil.
19. Morpholinepropanesulfonic acid (MOPs), Sigma-Aldrich, St Louis, EUA.
20. Placas de Petri descartáveis estéreis, J. Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil.
21. Placa estéril de 24 poços, Thermo Fischer Scientific, Denmark.
22. Placa Preta de 96 poços com fundo plano estéril, Thermo Scientific, Roskilde, DN, Brasil.
23. Ponteiras para micropipeta 20-200 uL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.
24. Ponteiras para micropipeta 100-1000 uL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.
25. Ponteiras para pipeta 10 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.
26. Ponteiras para pipeta 5 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.
27. Resina Acrílica Termopolimerizável do tipo base Vipi Wave®, VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil.
28. Sabonete Líquido Dettol®, Reckitt Benckiser (Brasil) LTDA, São Paulo, SP, Brasil.
29. Sabonete Líquido Lifebuoy®, Unilever (Brasil), Vinhedo, SP, Brasil
30. Sabonete Líquido Protex®, Colgate-Palmolive, São Paulo-SP, Brasil.
31. Solução salina tamponada com fosfato (PBS), Laboratório de Microbiologia - 4º andar – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara, São Paulo.
32. Soro fetal bovino estéril, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
33. Tripsina 0,5% e EDTA 0,2%, GIBCO Products Internacional, Inc., Langley, OK, USA.
34. Tubo cônico de polipropileno de alta transparência de 15 e 50 mL, Corning Science México.
35. Tubo tipo Eppendorf 1,5 mL, Axygen Scientific, Union City, Ca, USA.
36. Tubo tipo Falcon 15 mL, TPP, Trasadingen, Suíça.
37. Tubo tipo Falcon 50 mL, TPP, Trasadingen, Suíça.
38. Vaselina Sólida, Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Araraquara, SP, Brasil.

4.2 Instrumentais

1. Béquer graduado, Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil.
2. Bico de Bunsen,), Laboratório de Microbiologia - 4º andar – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara, São Paulo.
3. Broca Maxi-cut carboneto de tungstênio, Labordental, São Paulo, SP.
4. Caneta, Faber Castell, São Carlos, SP, Brasil.
5. Câmara de contagem Neubauer espelhada Modelo: k5-0111, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
6. Erlenmeyer graduado, Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil.

7. Espátula nº 24, DUFLEX, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
8. Espátula nº 36, DUFLEX, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
9. Faca para gesso – cabo de madeira, Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil.
10. Garrafa de vidro graduada com tampa 250 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
11. Garrafa de vidro graduada com tampa 500 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
12. Garrafa de vidro graduada com tampa 1000 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
13. Graal para espatulação de gesso – plástico, JOX, São Paulo, SP, Brasil.
14. Matriz pré-confeccionada para obtenção dos corpos de prova de resina acrílica do tipo base, com diâmetro de 1,4 mm e espessura de 1,2 mm, Araraquara, SP, Brasil.
15. Micropipeta de 1000-5000 uL, Boeco, Alemanha.
16. Micropipeta de 100-1000 uL, Boeco, Alemanha.
17. Micropipeta de 20-200 uL, Boeco, Alemanha.
18. Muffa acrílica própria para micro-ondas, STG – VIPI, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.
19. Pinça clínica, DUFLEX, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
20. Pincel Faber Castell nº6, São Carlos, SP, Brasil.
21. Pipetador automático eppendorf Modelo: Easypet 3, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha.
16. Placa de vidro jateada com óxido de zinco com 15 mm, JOX, São Paulo, SP, Brasil.
17. Placa de vidro polida com 10 mm, JOX, São Paulo, SP, Brasil.
18. Pote Dappen em vidro, Maquira, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- 19 Régua milimetrada, Faber Castell, São Carlos, SP, Brasil.

4.3 Equipamentos

1. Agitador de tubos orbital Modelo AP 56, Phoenix Industria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil.
2. Agitador de tubos Modelo: A162, Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil
3. Agitador tipo vórtex modelo: VM-3000, Vixar, Plymouth, MN, USA.
4. Autoclave horizontal de bancada Modelo AB 25, série:03026,Phoenix Ind. E Com. De Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil.
5. Autoclave Vertical modelo: AV 60 nº 6614, Phoenix Ind. E Com. De Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil.
6. Balança de precisão Modelo: BG 400 nº 016450, GEHAKA – Ind. E Com. Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil.

7. Balança de precisão Modelo BG 440 nº 1010, GEHAKA – Ind. E Com. Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil.
8. Banho Maria Modelo 1102, Fanem, Guarulhos, SP, Brasil.
9. Câmara de fluxo laminar vertical, Pachane Indústria e Comércio Limitada, Piracicaba, SP, Brasil.
10. Contador de colônias CP 600 Plus, Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil.
11. Centrífuga Modelo: 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.
12. Estufa bacteriológica Modelo: MA 0324, Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, SP, Brasil.
13. Estufa de cultura Modelo: 002CB, Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
14. Estufa de CO2 modelo 3100, Thermo Scientific, Marietta, Ohio, USA.
- 15 Estufa de secagem e esterilização Modelo: MA 033, Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil
16. Espectrofotômetro Bio Photometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha
17. Espectrofotômetro portátil Color Guide Sphere; BYK-Gardner.
18. Fluoroskan Ascent FI, Thermo Fisher Scientific, Marietta, Ohio, USA.
19. Incubadora de agitação orbital, Quimis Aparelhos científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil.
20. Micromet 2100 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA
21. Microscópio Invertido Modelo: 403, Optiphase, Van Nuys, CA, USA.
22. Phmetro de bancada Modelo: Q400AS, Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil.
23. Prensa Hidráulica, Delta, São Paulo, SP, Brasil.
24. Rugosímetro Digital, fabricado por Mytutoyo Corporation, Tóquio, Japan; Modelo: SJ401.

4.4 Metodologia

4.4.1 Preparo da Mufla

Para a confecção dos corpos de provas da resina acrílica termopolimerizável (Vipi Wave®), foram utilizadas matrizes de metal em forma de disco com orifícios de 14 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura, as quais foram incluídas em mufla (Figura 1).

Para a inclusão das matrizes em posição, a parte inferior da mufla foi preenchida com gesso pedra tipo III, proporcionado de acordo com as recomendações do fabricante. Antes da presa do gesso, a matriz foi inserida sobre ele até alcançar o nível da parte inferior da mufla

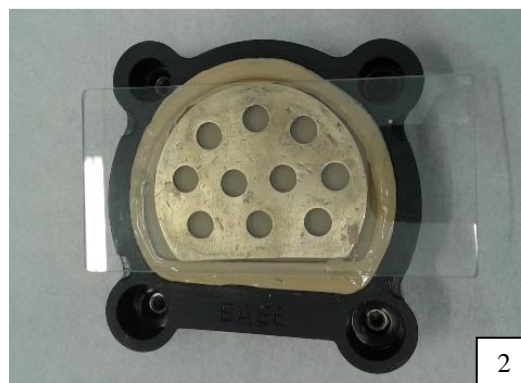
(Figura 2). Após a presa, todo o conjunto foi recoberto com uma fina camada de isolante para gesso. A seguir, uma placa de vidro medindo 4,0 cm x 4,0 cm x 0,5 cm foi posicionada sobre a matriz, e a parte superior da mufla, adequadamente isolada com vaselina sólida, foi adaptada e preenchida com nova porção de gesso pedra tipo III (Figuras 3 e 4). A mufla foi posicionada em prensa hidráulica com 0,5 toneladas de pressão até a presa do gesso.

Figura 1- Matriz metálica.



Fonte: Elaboração Própria

Figura 2- Base da mufla juntamente com a matriz metálica e placa de vidro.



Fonte: Elaboração Própria

Figura 3- Parte inferior e superior da mufla unidas



Fonte: Elaboração Própria

Figura 4- Mufla preenchida com gesso.



Fonte: Elaboração Própria

Dessa forma, obtivemos as muflas com as matrizes metálicas incluídas, para confeccionarmos os corpos de prova (Figura 5).

Figura 5- mufla pronta para a confecção dos corpos de prova.



Fonte: Elaboração Própria

4.4.2 Confecção do Corpo de Prova

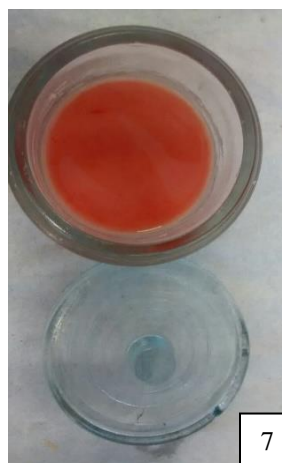
Os corpos de prova da resina acrílica para base de próteses Vipi Wave® foram confeccionados a partir de matrizes metálicas incluídas em mufla como descrito anteriormente. As matrizes foram isoladas com isolante para resina acrílica Cel-Lac (Figura 6). E a resina, proporcionada e manipulada de acordo com as recomendações do fabricante (14 g de resina / 6,5 mL de monômero), na sua fase plástica (Figura 7), foi inserida na matriz metálica até seu total preenchimento (Figuras 8). Posteriormente, as partes superior e inferior da mufla foram encaixadas e o conjunto foi levado novamente à prensa hidráulica sob pressão de 1,25 toneladas e assim mantido até que ocorresse a estabilização da pressão (Figura 9).

Figura 6- Isolamento com Cel-Lac.



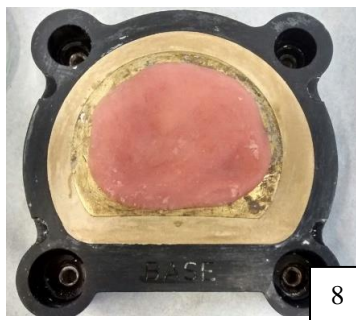
Fonte: Elaboração Própria

Figura 7- Resina acrílica manipulada



Fonte: Elaboração Própria

Figura 8- Resina acrílica na fase plástica inserida na matriz metálica.



Fonte: Elaboração Própria

Figura 9- Mufla na prensa hidráulica sob pressão de 1,25 toneladas.



Fonte: Elaboração Própria

Em seguida, os parafusos foram colocados em posição e a mufla foi retirada da prensa. Então, a resina acrílica foi polimerizada em micro-ondas doméstico seguindo as recomendações do fabricante (para forno de 800 a 1100W- 20 minutos com 10% de potência + 5 minutos com 50% de potência). Após a polimerização, aguardamos o resfriamento da mufla sobre bancada (2 horas) e separamos suas partes para desinclusão dos corpos de prova (Figura 10). Os excessos de resina foram recortados de cada corpo de prova com o auxílio de uma tesoura de forma que fossem individualizados (Figuras 11 e 12).

Após a obtenção dos corpos de prova, a rugosidade superficial foi mensurada com o intuito de padronizar as amostras e homogeneizar os grupos. Foram selecionados para os testes as amostras que possuíam rugosidade 2,7 e 3,7 μm (Panariello et al.⁷¹, 2015).

Figura 10- corpos de prova da resina acrílica sendo desincluídas



Fonte: Elaboração Própria

Figura 11- remoção dos excessos.



Fonte: Elaboração Própria

Figura 12- Corpos de provas finalizados.

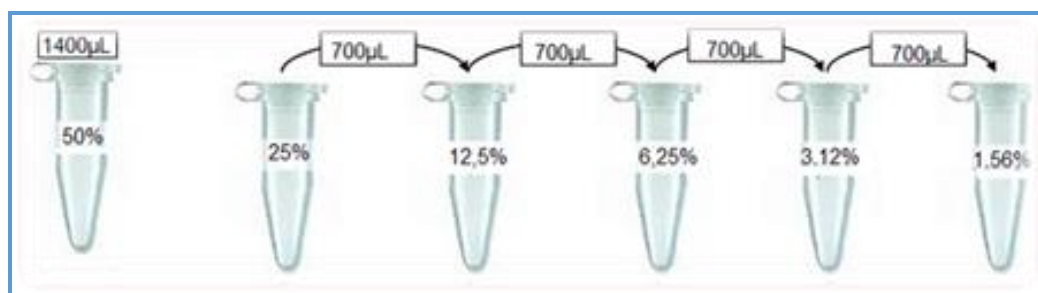


Fonte: Elaboração Própria

4.4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a realização da diluição dos sabonetes (Figura 13), foram utilizados 12 ependorfs. No 1º ependorf foram colocados 1300 µL do sabonete já diluído em 50% (50% sabonete + 50% de solução salina.), no 2º ependorf até o 12º ependorf foram colocados 700 µL de de solução salina. O sabonete foi sendo diluído retirando-se 700 µL de solução do 1º ependorf para o 2º, e novamente do 2º ependorf para o 3º e assim sucessivamente até o 12º.

Figura 13- Diluição seriada dos sabonetes



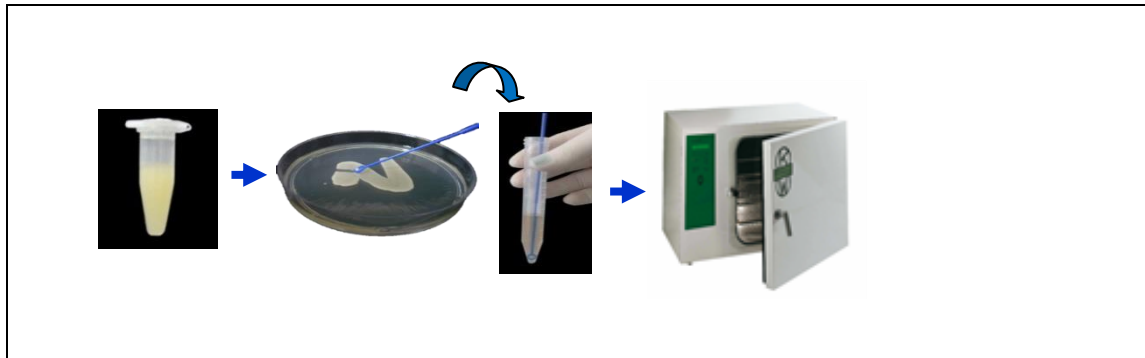
Fonte: Elaboração própria

Para a realização do CIM o primeiro passo foi a reativação do micro-organismo. A cepa utilizada foi ATCC 90028, a qual contém cerca de 0,25mL de cultura (micro-organismo mais meio de cultura específico mais glicerol) armazenado em freezer -80 a -70°C.

A reativação dos micro-organismos (*Candida albicans*) ocorreu por meio da técnica de Placa com Semeadura Direta. Primeiramente, o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD) foi retirado da geladeira e permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos. O tubo com o meio de cultura foi removido do freezer, descongelado rapidamente e então foi aberto assepticamente em chama do bico Bunsen. Em seguida, com uma alça esterilizada, foi retirada uma alíquota da cultura. Uma placa com meio de cultura sólido, usando o método de esgotamento por quadrante, uma alíquota foi estriada, e a placa foi incubada por 24 a 48h (até o aparecimento de colônias bem definidas) a 37°C e 5% CO₂.

Após o crescimento das colônias foi feito o pré-inóculo (Figura 14). Primeiramente, de maneira asséptica, em tubos tipo Falcon foram adicionados 10 ml do meio de cultura YNB específico para crescimento da cepa. Em seguida, com uma alça de inoculação, coletamos 5 colônias que foram selecionadas aleatoriamente na placa. O tubo foi levado ao aparelho Vortex e incubado na estufa a 37°C por 16 horas.

Figura 14 - Descongelamento da cepa de *Candida albicans*. Coleta de uma alçada da cepa descongelada e inoculação em RPMI, e incubado por 16 horas.

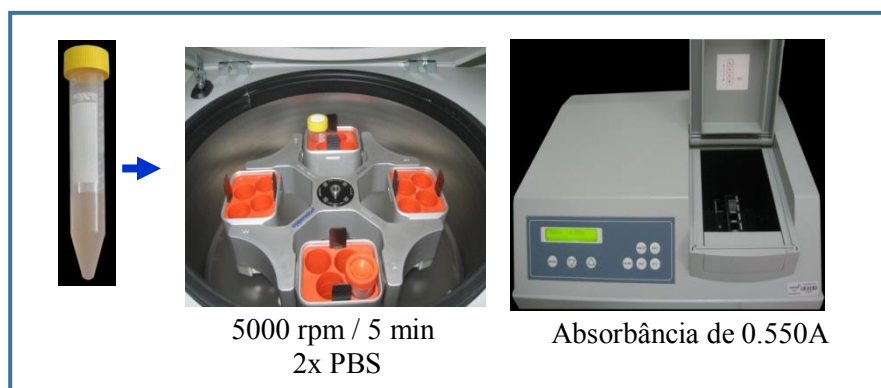


Fonte: Elaboração própria.

Passado esse período de incubação, o inóculo foi realizado. No dia anterior foi deixado um tubo Falcon com 9,5 ml do meio de cultura YNB em estufa estéril, para realizar a diluição na razão de 1:20 do pré-inóculo (ou seja, 9,5 ml de meio de cultura líquido estéril mais 0,5 ml do pré-inóculo). Então o tubo foi vortexado. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro (Figura 15) com filtro de 540 nm e o inóculo foi incubado por 8 horas na estufa a 37°C. Depois das 8 horas, o tubo Falcon foi removido da estufa e nova leitura foi realizada para averiguar se houve crescimento do micro-organismo. Com o valor final obtido, o valor inicial foi subtraído. Os resultados esperados são aproximadamente 0,550 A.

Confirmando o crescimento dos micro-organismos, o tubo foi levado a centrifuga por 5 minutos para formação de “pellet”. Em seguida, foi lavado com PBS, levado novamente para centrífuga e novamente lavado com PBS. Após as duas lavagens os micro-organismos foram suspensos novamente no meio RPMI.

Figura 15 - Padronização da cepa em espectrofotômetro

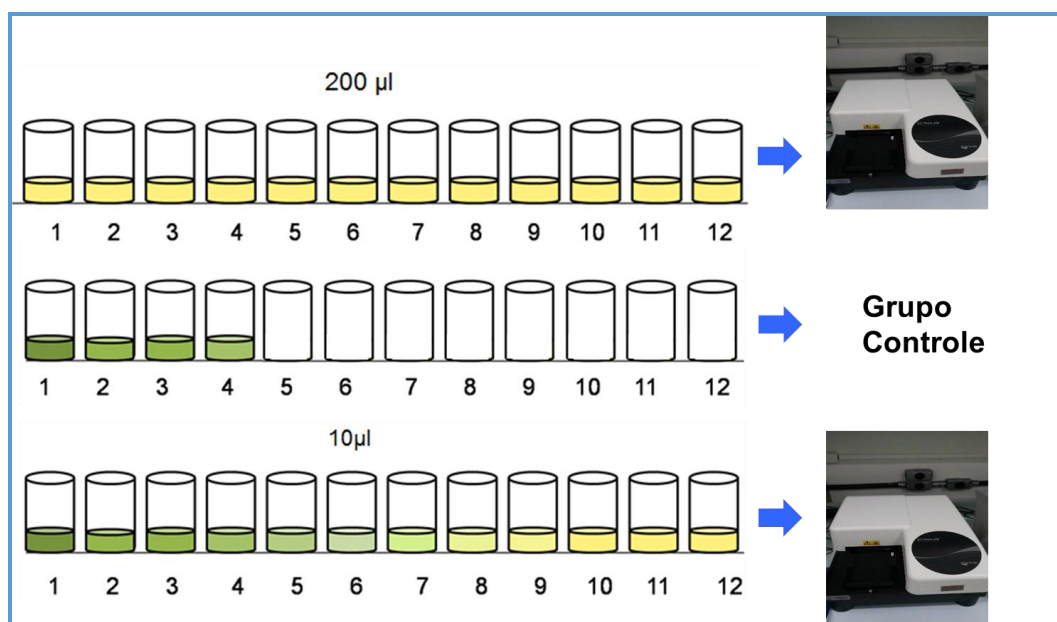


Fonte: Elaboração própria.

Em uma placa de 96 poços foram colocados 200 μ L de cada diluição do sabonete em cada poço, em triplicata. Além disso, também em triplicata, foram acrescentados aos orifícios da placa os seguintes grupos: meio RPMI, meio RPMI no qual será adicionado o micro-organismo, sabonete e nistatina. Então, foi feita a leitura inicial no leitor de Eliza dos resultados sem o micro-organismo (Figura 16).

Posteriormente, 10 μ L da solução contendo os micro-organismos foram adicionadas nos poços da placa (com exceção do controle de meio RPMI e do controle do sabonete). Em seguida, nova leitura no leitor de Elisa foi realizada.

Figura 16 - placa de 96 poços onde foram colocados 200 μ L de cada diluição do sabonete em cada poço, em triplicata. Também em triplicata, foram acrescentados aos orifícios da placa os seguintes grupos: meio RPMI, meio RPMI no qual será adicionado o micro-organismo, sabonete e nistatina. Então, foi feita a leitura inicial no leitor de Eliza dos resultados sem o micro-organismo.



Fonte: Elaboração própria.

A placa de 96 poços foi então armazenada em estufa por 24 horas. Após este período, nova leitura em Elisa foi feita. O crescimento de micro-organismo em cada poço foi visualmente analisado. Os poços onde o crescimento não foi observado foram plaqueados para determinação do CIM e levados a estufa por 24 horas. Passando esse período, foi realizada a

contagem das UFCs nas placas. A CIM foi confirmada no poço onde não houve crescimento de micro-organismo após o plaqueamento. Cada experimento foi realizado em 3 ocasiões distintas obtendo assim o valor da concentração inibitória mínima de cada sabonete.

4.4.4 Sabonetes desinfetantes utilizados

A marca comercial e a composição química de cada sabonete desinfetante (fornecida pelos fabricantes) estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Marca comercial e composição química dos sabonetes desinfetantes:

Composição:		
Protex®	Dettol®	Lifebouy®
Aqua, Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropiyl Betaine, Glycol Distearate and Sodium Laureth Sulfate and Cocamide MEA and Laureth-10, PPG-2 Hydroxyethyl Cocamide, Decyl Glucoside, Laureth-7, Parfum, Citric Acid, Sodium Benzoate, Polyquaternium-7, Triclocarban, Tetrasodium EDTA, Poloxamer 124, Fucus Vesiculosos Extract, Sodium Chloride, Methylchloroisothiazolinone and Methylisothiazolinone, Hexyl Cinnamal, Limonene, Butylphenyl Methylpropional, Citronellol.	Aqua, Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropiyl Betaine, Salicylic Acid, Chloroxylenol, Glycerin, Polyquaternium-7, Tetrasodium EDTA, Methylchloroisothiazolinone & Methylisothiazolinone, Acrylates/PEG-10 Maleate, Styrene Copolymer, Parfum, Sodium Hydroxide, Citric acid, Sodium Chloride	Aqua, Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropiyl Betaine, Parfum, Cocamide MEA, Acrylates Copolymer, Sodium Chloride, PPG-9, Lactic Acid, Glycol Distearate, Glycerin, Helianthus Annuus Seed Oil, Sodium Hydroxide, Tetrasodium EDTA, Styrene/Acrylates Copolymer, Dried Cream, Terpeneol, Thymol, Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone, Alpha-Isomethyl ionone, Benzyl Salicylate, Butylphenyl Methylpropional, Citronellol, Coumarin, Geraniol, Hexyl Cinnamal, Limonene, Linalool.

Fonte: Elaboração própria

4.4.5 Medidas de pH

Após a determinação dos MICs, foram feitas as aferições dos valores de pH das diluições utilizadas neste estudo com o auxílio de um pHmetro digital de bancada (Quimis, modelo Q400AS).

4.4.6 Grupos Experimentais

Após armazenamento por 48 horas (tempo zero), as amostras foram divididas em grupos de acordo com o tipo de sabonete líquido desinfetante. As diluições utilizadas para cada sabonete foram determinadas, tendo sido selecionadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para as cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028), sendo a do DETTOL® na diluição de 0,39%, a do PROTEX® a diluição de 0,78%, e a diluição de 3,12% para o sabonete LIFEBOUY®. Em função da elevada diluição realizada para se obter as CIMs, as soluções permaneceram com aspecto transparente (incolor), semelhante à água. Mesmo assim, tomou-se o cuidado de se utilizar somente sabonetes neutros de cor branca e/ou transparente, disponíveis no mercado. Os grupos experimentais foram:

AD: as propriedades foram avaliadas aos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em ÁGUA DESTILADA à 37o C, sendo a água destilada trocada diariamente (grupo controle);

SD: as propriedades foram avaliadas aos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, com ciclos de imersão diária em sabonete líquido DETTOL®, por 8 horas a temperatura ambiente, seguido de imersão em água destilada por mais 16 horas à 37o C, simulando a desinfecção noturna das próteses, sendo a solução desinfetante e a água destilada trocada diariamente;

SP: as propriedades foram avaliadas aos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, com ciclos de imersão diária em sabonete líquido PROTEX®, por 8 horas a temperatura ambiente, seguido de imersão em água destilada por mais 16 horas à 37o C, simulando a desinfecção noturna das próteses, sendo a solução desinfetante e a água destilada trocada diariamente.

SL: as propriedades foram avaliadas aos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, com ciclos de imersão diária em sabonete líquido LIFEBOUY®, por 8 horas a temperatura ambiente, seguido de imersão em água destilada por mais 16 horas à 37o C, simulando a desinfecção noturna das próteses, sendo a solução desinfetante e a água destilada trocada diariamente.

4.4.7 Capacidade de Formação de Biofilme

Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC):

Foi então realizada a etapa de reativação do micro-organismo e feito o pré-inóculo e o inóculo, da mesma maneira como descrita na fase de determinação dos CIM's.

A cepa utilizada foi ATCC 90028, a qual contém cerca de 0,25mL de cultura (micro-organismo mais meio de cultura específico mais glicerol) armazenado em freezer -80 a -70°C.

A reativação dos micro-organismos ocorreu por meio da técnica de Placa com Semeadura Direta. Primeiramente, o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD) foi retirado da geladeira e permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos. O tubo com o meio de cultura foi removido do freezer, descongelado rapidamente e então foi aberto assepticamente em chama do bico Bunsen. Em seguida, com uma alça esterilizada, foi retirada uma alíquota da cultura. Uma placa com meio de cultura sólido, usando o método de esgotamento por quadrante, uma alíquota foi estriada, e a placa foi incubada por 24 a 48h (até o aparecimento de colônias bem definidas) a 37°C, 5% CO₂.

Após o crescimento das colônias foi feito o pré-inóculo. Primeiramente, de maneira asséptica, em tubos tipo Falcon foram adicionados 10 mL do meio de cultura YNB específico para crescimento da cepa. Em seguida, com uma alça de inoculação, coletamos 5 colônias que foram selecionadas aleatoriamente na placa. O tubo foi levado ao aparelho Vortex e incubado na estufa a 37°C por 16 horas.

Passado esse período de incubação, o inóculo foi realizado. No dia anterior foi deixado um tubo Falcon com 9,5 ml do meio de cultura YNB em estufa estéril, para realizar a diluição na razão de 1:20 do pré-inóculo (ou seja, 9,5ml de meio de cultura líquido estéril mais 0,5mL do pré-inóculo). Então o tubo foi vortexado. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro com filtro de 540nm e o inóculo foi incubado por 8 horas na estufa a 37°C. Depois das 8 horas, o tubo Falcon foi removido da estufa e nova leitura foi realizada para averiguar se houve crescimento do micro-organismo. Com o valor final obtido, o valor inicial foi subtraído. Os resultados esperados são aproximadamente 0,550 A, o que corresponde a 1×10^6 ufc/mL de *Candida albicans*. Confirmando o crescimento dos micro-organismos, o tubo foi levado a centrifuga por 5 minutos para formação de “pellet”. Em seguida, foi lavado com PBS, levado para a centrífuga e novamente lavado com PBS. Após as duas lavagens os micro-organismos foram novamente ressuspensos em meio RPMI, assim foram obtidas alíquotas de meio contendo 10^6 ufc/mL de *Candida albicans*.

Para a análise da capacidade de formação de biofilme, os corpos de prova de cada grupo experimental (n=6) foram individualmente colocados em uma placa colocados em uma placa de 24 poços contendo 750 uL da alíquota de meio com *Candida albicans* e incubados por 90 minutos em incubadora de agitação orbital a 37°C e 76 rpm, para adesão das células.

Após esse tempo, removeu-se todo o conteúdo dos poços da placa e lavou duas vezes com 1500 ul de PBS para remoção das células não aderidas. Três corpos de prova de cada grupo experimental foram removidos dos poços contaminados e transferidos para uma

nova placa para avaliação da capacidade de formação de biofilme após essa fase de adesão. Ao restante da placa foram adicionados 1500 μ L de meio RPMI novo e levado novamente à incubadora por 24 horas para a formação de biofilme maduro (sendo o meio RPMI renovado após 12 horas).

Os corpos de prova removidos dos poços contaminados e transferidas para uma nova placa receberam 150 μ L de solução salina estéril. Em seguida, os corpos de prova foram raspados com ponta de pipeta estéril por 1 minuto, para desprender o biofilme formado. Posteriormente, foram realizadas 4 diluições a partir desta solução resultante.

Para isso, uma alíquota de 100 μ L da solução resultante foi pipetada e transferida para um eppendorf contendo 900 μ L de solução salina estéril. Este último tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos e uma nova alíquota de 100 μ L foi removida do mesmo e colocada em outro eppendorf contendo 900 μ L de solução salina. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada corpo-de-prova e, desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas. Essas diluições foram utilizadas para semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 5 μ g/mL de cloranfenicol. Foram pipetados 25 μ L da diluição 10^{-3} e da diluição de 10^{-4} na placa de Petri. O mesmo procedimento foi realizado com os corpos de prova que ficaram em incubadora para formação de biofilme de 24 horas.

Os procedimentos de semeadura foram realizados após a fase de adesão (90 minutos: denominado tempo 0), e após 24h, em triplicata. Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri foram submetidas a contagem de colônias. Para este procedimento, cada placa de Petri teve suas colônias contadas da forma padrão. A quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados.

Avaliação da Proliferação Celular por Meio do Teste alamarBlue®:

A proliferação celular do biofilme de *Candida albicans* também foi monitorada usando o teste alamarBlue®, uma técnica que mede a viabilidade celular por meio da atividade das enzimas mitocondriais. A mudança de cor no teste representa a atividade metabólica do biofilme. Imediatamente após a fase de adesão dos micro-organismos sobre as amostras de resina, o biofilme foi lavado 2 vezes com PBS e foram colocados 1500 μ L meio de cultura novo em cada orifício da placa. Em seguida, foram acrescentados 150 μ L de solução de alamarBlue®. As placas foram, então, colocadas na incubadora de agitação orbital a 37°C e 76 rpm.

Após 4 horas foi realizada a primeira leitura e 24 horas depois foi realizada a segunda leitura de fluorescência. A fluorescência das amostras foi medida usando Fluoroskan Ascent a 560 nm (A560) e 590 nm (A590).

4.4.8 Capacidade de redução de biofilme

Semelhante ao teste de capacidade de formação de biofilme foi realizada a etapa de reativação do micro-organismo e feito o pré-inóculo e o inóculo, da mesma maneira como descrita na fase de determinação dos CIM's.

A cepa utilizada foi ATCC 90028, a qual contém cerca de 0,25 mL de cultura (micro-organismo mais meio de cultura específico mais glicerol) armazenado em freezer -80 a -70°C. A reativação dos micro-organismos ocorreu por meio da técnica de Placa com Semeadura Direta. Primeiramente, o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD) foi retirado da geladeira e permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos. O tubo com o meio de cultura foi removido do freezer, descongelado rapidamente e então foi aberto assepticamente em chama do bico Bunsen. Em seguida, com uma alça esterilizada, foi retirada uma alíquota da cultura. Uma placa com meio de cultura sólido, usando o método de esgotamento por quadrante, uma alíquota foi estriada, e a placa foi incubada por 24 a 48h (até o aparecimento de colônias bem definidas) a 37°C, 5% CO₂.

Após o crescimento das colônias foi feito o pré-inóculo. Primeiramente, de maneira asséptica, em tubos tipo Falcon foram adicionados 10 ml do meio de cultura YNB específico para crescimento da cepa. Em seguida, com uma alça de inoculação, coletamos 5 colônias que foram selecionadas aleatoriamente na placa. O tubo foi levado ao aparelho Vortex e incubado na estufa a 37°C por 16 horas.

Passado esse período de incubação, o inóculo foi realizado. No dia anterior foi deixado um tubo Falcon com 9,5 ml do meio de cultura YNB em estufa estéril, para realizar a diluição na razão de 1:20 do pré-inóculo (ou seja, 9,5ml de meio de cultura líquido estéril mais 0,5ml do pré-inóculo). Então o tubo foi vortexado. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro com filtro de 540nm e o inóculo foi incubado por 8 horas na estufa a 37°C. Depois das 8 horas, o tubo Falcon foi removido da estufa e nova leitura foi realizada para averiguar se houve crescimento do micro-organismo. Com o valor final obtido, o valor inicial foi subtraído. Os resultados esperados são aproximadamente 0,550 A, o que corresponde a 1×10^6 ufc/mL de *Candida albicans*. Confirmando o crescimento dos micro-organismos, o tubo foi levado a centrifuga por 5 minutos para formação de "pellet". Em seguida, foi lavado com PBS, levado

para a centrífuga e novamente lavado com PBS. Após as duas lavagens os micro-organismos foram novamente ressuspensos em meio RPMI, assim foram obtidas alíquotas de meio contendo 10^6 ufc/mL de *Candida albicans*.

Para a análise de redução de biofilme, os corpos de prova (n=9) permaneceram 48 horas imersos em água destilada em estufa a 37°C e 5% de CO₂, para remoção do excesso de monômero, foram lavados em água corrente e colocados em ultrassom por 20 minutos de cada lado, para remoção de possíveis resíduos da superfície. Após isso, os corpos de prova foram colocados sobre um papel alumínio no fluxo laminar, sobre luz ultravioleta, por 20 minutos de cada lado, para desinfecção da superfície e foram individualmente colocados em uma placa de 24 poços contendo 750 uL da alíquota de meio com *Candida albicans* e incubados por 90 minutos em incubadora de agitação orbital a 37°C e 76 rpm, para adesão das células.

Após esse tempo, removeu-se todo o conteúdo dos poços da placa e lavou duas vezes com 1500 µL de PBS para remoção das células não aderidas. Adicionou-se 1500 µL de meio RPMI novo, e levou novamente para a incubadora por 48 horas para a formação de biofilme maduro (sendo o meio RPMI renovado após 24 horas).

Os sabonetes foram diluídos em solução salina nas suas devidas concentrações inibitórias mínimas (CIM), e após as 48 horas de maturação do biofilme a placa foi removida da incubadora e o meio de todos os poços retirados, foi então adicionado a cada três deles uma solução de acordo com o grupo experimental sendo: Água destilada, Protex® 3,12%, Dettol® 0,39%, Lifebuoy® 0,78%, e a placa levada novamente a incubadora por 8 horas.

Após esse período, cada poço da placa foi lavado duas vezes com PBS, e todos os corpos de prova foram removidos dos poços contaminados e transferidas para uma nova placa com o poço contendo 150 ul de solução salina estéril. Em seguida, os corpos de prova foram raspados com ponta de pipeta estéril por 1 minuto, para desprender o biofilme formado. Posteriormente, foram realizadas 2 diluições a partir desta solução resultante. Para isso, uma alíquota de 100 µL da solução resultante foi pipetada e transferida para um eppendorf contendo 900 ul de solução salina estéril. Este tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos e uma nova alíquota de 100 µL foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 900 ul de solução salina. Desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} e 10^{-2} foram obtidas. Essas diluições foram utilizadas para semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 5 µg/mL de cloranfenicol. Foram pipetados 25 µL da diluição 10^{-1} e da diluição de 10^{-2} na placa de Petri.

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri foram submetidas a contagem de colônias. Para este procedimento, cada placa de Petri teve suas colônias contadas da forma padrão. A quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados. Todos os procedimentos foram realizados em três ocasiões distintas.

4.4.9 Citotoxicidade

Após a imersão nas soluções dos sabonetes desinfetantes, as amostras de cada grupo experimental (n=9) foram lavadas em água corrente para remoção do excesso das soluções desinfetantes. Em seguida, foram desinfetadas em luz ultravioleta, na capela de fluxo laminar, por 20 minutos para cada lado do corpo de prova com o objetivo de eliminar os possíveis microorganismos remanescentes (Sheridan et al.⁸⁴, 1997).

Para a análise do efeito citotóxico das substâncias incorporadas e liberadas pelos corpos de prova foram obtidos extratos dessas amostras (International Standard³⁶ 2007; Lefebvre et al.⁴⁷, 1995; Schuster⁸¹ 1995; Sheridan et al.⁸⁴, 1997; Wennberg et al.⁹⁵, 1979). Para isso, três corpos-de-prova de cada grupo experimental (n=3) foram colocados dentro de tubos de ensaio com 3 mL de meio de cultura Eagle e incubados a 37°C por 24 horas (ISO 10993-12: 1992). Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas foram difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos que foram utilizados nos testes de citotoxicidade. Um tubo de ensaio contendo apenas 3 mL de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo. Além disso, três corpos de prova de cada resina (n=3), logo após a confecção e sem armazenamento em soluções desinfetantes, também foram colocados dentro de tubos de ensaio com 3 mL de meio de cultura Eagle e incubados a 37°C por 24 horas.

O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelas resinas foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, queratinócitos humanos normais (células HaCaT) foram propagados em meio de cultura de DMEM suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/ml de gentamicina. O cultivo das células foi realizado em frascos para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO₂. Esses frascos foram incubados em estufa para cultura de células com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada. É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em área asséptica dentro da capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70% e luz ultravioleta por 20 minutos.

Para a realização do teste de citotoxicidade, uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ células/mL de meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo da garrafa utilizando-se solução de Tripsina/EDTA. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 mL e levada para uma centrífuga especial autobalanceável por 5 minutos a 1.500 rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/mL de gentamicina, foi acrescentado e as células misturadas a ele. A partir daí, 10 µL foram retirados e adicionados a 90 µL de corante azul de Tripán. Dessa solução, 10 µL foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico com aumento de 40x. Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL de meio de cultura para posterior utilização nos testes de citotoxicidade, variando-se apenas o volume da suspensão.

No presente estudo, a proliferação celular foi verificada por meio da utilização do teste alamarBlue®. O alamarBlue® é um teste simples e rápido, em que 10% da solução comercialmente disponível são adicionados ao meio celular e medidos tanto por colorimetria ou fluorimetria (O'Brien et al.⁶⁹, 2000). No entanto, maior sensibilidade é conseguida utilizando a propriedade fluorescente. Além disso, o alamarBlue® não é tóxico para as células e não se faz necessário eliminar as células para obter medições, como ocorre com o teste MTT (Wiegand et al.⁹⁶, 2008). Para a realização do teste, 100 uL da suspensão composta de $1,0 \times 10^5$ células/ml, ou seja, $1,0 \times 10^4$ células, foram colocados em cada compartimento de uma placa com 96 orifícios, incubada em estufa com 5% de CO₂, a 37°C por 24 horas. Após tal período de incubação, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa, e 50 uL de meio de cultura novo foram colocados em cada orifício da placa juntamente com 50 uL do extrato contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, a qual foi incubada por 24 horas em estufa com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C. Para cada grupo experimental, foram destinados quatro compartimentos da placa (análise em quadruplicata). Quatro orifícios da placa não receberam o extrato das substâncias liberadas e receberam apenas 100 uL de meio de cultura (grupo controle negativo). A seguir, para cada orifício da placa foram adicionados mais 20 µL de alamarBlue® diluídos em 100 uL de meio de cultura (10% do volume total de meio – 200 µL). A placa foi, então, incubada por mais 4 horas. A fluorescência das amostras foi medida usando Fluoroskan Ascent (Lab Systems) a 560 nm

(A560) e 590 nm (A590). Todos experimentos descritos acima foram realizados em três ocasiões distintas.

4.4.10 Rugosidade

Os corpos de prova de cada grupo (n=15) foram submetidos à leitura da rugosidade superficial por meio da utilização de um rugosímetro com precisão de 0,01 μm . Foram realizadas três leituras para cada amostra, em locais distintos dentro de uma área pré-determinada e semelhante para todos os espécimes. Em seguida, os valores médios das três leituras foram obtidos. O parâmetro Ra foi escolhido a fim de proporcionar condições de comparação com resultados de outros estudos, traduzindo o valor da média aritmética de todas as distâncias absolutas do perfil da rugosidade (Ra). Os procedimentos foram realizados em 3 ocasiões distintas.

4.4.11 Dureza

A dureza dos dentes artificiais de cada grupo (n=15) foi obtida usando um diamante Vickers, o qual é uma ferramenta válida para avaliar a dureza e respostas viscoelásticas de polímeros. As medidas foram realizadas no aparelho Micromet 2100, com 50 gf de força por 10 s. Foi realizada a leitura dos comprimentos das diagonais imediatamente após cada avanço, com um período curto (10 segundos), evitando, assim, a recuperação viscoelástica das diagonais. Quatro penetrações foram realizadas em cada amostra, e o valor médio foi calculado. Os procedimentos foram realizados em 3 ocasiões distintas.

4.4.12 Alteração de Cor

A alteração de cor dos corpos de prova (n=15) foi analisada por meio de um espectrofotômetro portátil utilizando-se como iluminante a luz do dia.

A mensuração da cor foi realizada por meio da quantificação do valor de tristímulo ($L^*a^*b^*$) de acordo com o sistema CIELAB (Commission Internationale de Eclairage). Nesse sistema, os eixos a^* e b^* representam a dimensão da tonalidade da cor. O eixo a^* representa a variação do vermelho ($+a^*$) até o verde ($-a^*$). Já, o eixo b^* representa a variação do amarelo ($+b^*$) até o azul ($-b^*$). O terceiro eixo deste sistema é a luminosidade (L^*), perpendicular aos demais eixos. L^* representa a variação do preto ($L^*=0$) até o branco ($L^*=100$). Foram realizadas três mensurações de cor, sendo então calculado o valor médio do tristímulo. A distância entre as coordenadas L^* , a^* e b^* após as avaliações em relação aos pontos determinados pelos

valores iniciais representaram o E obtido por meio da seguinte fórmula: $\Delta E = \frac{1}{2} [(L1 - L0)^2 + (a1 - a0)^2 + (b1 - b0)^2]$ (Sham et al. ⁸³, 2004). Para padronização das leituras de cor com o decorrer do tempo de avaliação, foi confeccionada uma linha de mira para amostra.

Essa linha foi posicionada, em todas as leituras, de forma a coincidir com o meio do corpo de prova. Dessa forma, as leituras foram realizadas sempre na mesma área, no centro do corpo de prova. Os procedimentos foram realizados em 3 ocasiões distintas.

4.4.13 Análise dos Resultados

Capacidade de formação de biofilme

Para avaliar se as imersões nas soluções desinfetantes interferiram na capacidade da formação de biofilme, nos diferentes períodos (7, 14, 21 e 28 dias), recorreu-se ao teste paramétrico de ANOVA Mista two-way seguido do teste post-hoc LSD.

O nível de significância de 5% foi adotado para a tomada de decisões. As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferências foram executadas com o software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicado, IL).

Capacidade de redução de biofilme

Para avaliar se o tipo de sabonete afeta significativamente no biofilme de *Cândida albicans* (UFC/mL) após um período de 8 horas, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn, respectivamente, devido a que os pressupostos de distribuição normal da variável dependente (UFC/mL) e homocedasticidade das variâncias nos diferentes grupos testados mostraram um $p > 0,05$ nos teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Utilizou-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferências foram executadas com o software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicado, IL).

Citotoxicidade

Para avaliar se o tipo de sabonete e se o tempo influenciou significativamente na citotoxicidade de uma resina acrílica utilizada em prótese, recorreu-se ao teste paramétrico de ANOVA two-way para amostras independentes seguido do teste post-hoc de Bonferroni. O pressuposto da distribuição normal da variável dependente (citotoxicidade) nos diferentes grupos definidos pelo cruzamento dos fatores “tipo de sabonete” e “tempo” foi avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk. Para todos os grupos obteve-se um $p > 0,05$. O pressuposto de

homogeneidade de variância foi avaliada com o Teste de Levene ($p = 0,428$). Utilizou-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferências foram executadas com o software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicado, IL).

Além disso, os resultados de cada grupo experimental foram comparados com o grupo controle (considerado 100% de viabilidade) e os desinfetantes incorporados às amostras foram classificados de acordo com o efeito citotóxico (International Standard³⁶ ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. 1992.) em: 0 – não citotóxico (inibição menor do que 25% em relação ao grupo controle), 1 – discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50% em relação ao grupo controle), 2 – moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75% em relação ao grupo controle) e 3 – intensamente citotóxico (inibição maior do que 75% em relação ao grupo controle).

Rugosidade

Para avaliar se o tipo de sabonete e o tempo afetam significativamente na rugosidade de um tipo de resina acrílica utilizada em próteses, recorreu-se ao teste paramétrico de ANOVA dois fatores seguido do teste post-hoc de Bonferroni. O pressuposto da distribuição normal da variável dependente (rugosidade), homocedasticidade das variâncias e esfericidade nos diferentes grupos definidos pelo cruzamento dos fatores “tipo de sabonete” e “tempo” foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk, Levene e Mauchly, respectivamente. Para todos os grupos obteve-se um $p > 0,05$. Utilizou-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferências foram executadas com o software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicado, IL).

Dureza

Para avaliar se o tipo de sabonete e se o tempo de armazenamento influenciaram significativamente na dureza de uma resina acrílica utilizada em prótese, recorreu-se ao teste paramétrico de ANOVA Mista two-way seguido do teste post-hoc de Bonferroni. O pressuposto da distribuição normal da variável dependente (dureza), homocedasticidade das variâncias e esfericidade nos diferentes grupos definidos pelo cruzamento dos fatores “tipo de sabonete” e “tempo de armazenamento” foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk, Levene e Mauchly, respectivamente. Para todos os grupos obteve-se $p > 0,05$. Utilizou-se um nível de significância

de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferências foram executadas com o software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicado, IL).

Alteração de cor

Para avaliar se o tipo de sabonete e o tempo de imersão influenciaram significativamente na alteração de cor, recorreu-se ao teste paramétrico de ANOVA Mista two-way seguido do teste post-hoc de Bonferroni e LSD. O pressuposto da distribuição normal da variável dependente (alteração de cor), homocedasticidade das variâncias e esferecidade nos diferentes grupos definidos pelo cruzamento dos fatores “tipo de sabonete” e “tempo” foram avaliados pelos testes de Shapiro-Wilk, Levene e Mauchly, respectivamente. Para todos os grupos obteve-se $p > 0,05$. Utilizou-se nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferências foram executadas com o software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicago, IL).

Os valores de alteração de cor obtidos também foram submetidos ao uma análise qualitativa, comparados com os padrões do National Bureau of Standards (NBS), no qual foi desenvolvido o sistema de unidades NBS para quantificar o valor crítico de alteração de cor (ΔE), representado pela fórmula: $NBS\ unit = \Delta E^* \times 0.92$. De acordo com esse sistema de classificação, a alteração de cor pode apresentar valores conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2- National Bureau of Standards (NBS)

0 e 0,5	imperceptível, para alterações de cor extremamente pequenas
0,5 e 1,5	leve, para alterações de cor pequenas
1,5 e 3,0	perceptível, para alterações perceptíveis ao olho nu
3,0 e 6,0	significativa, para alterações de cor elevadas;
6,0 e 12	grande, para alterações de cor excessiva
12 ou mais	muito grande, alteração para outra cor.

Fonte: Elaboração Própria

5 RESULTADO

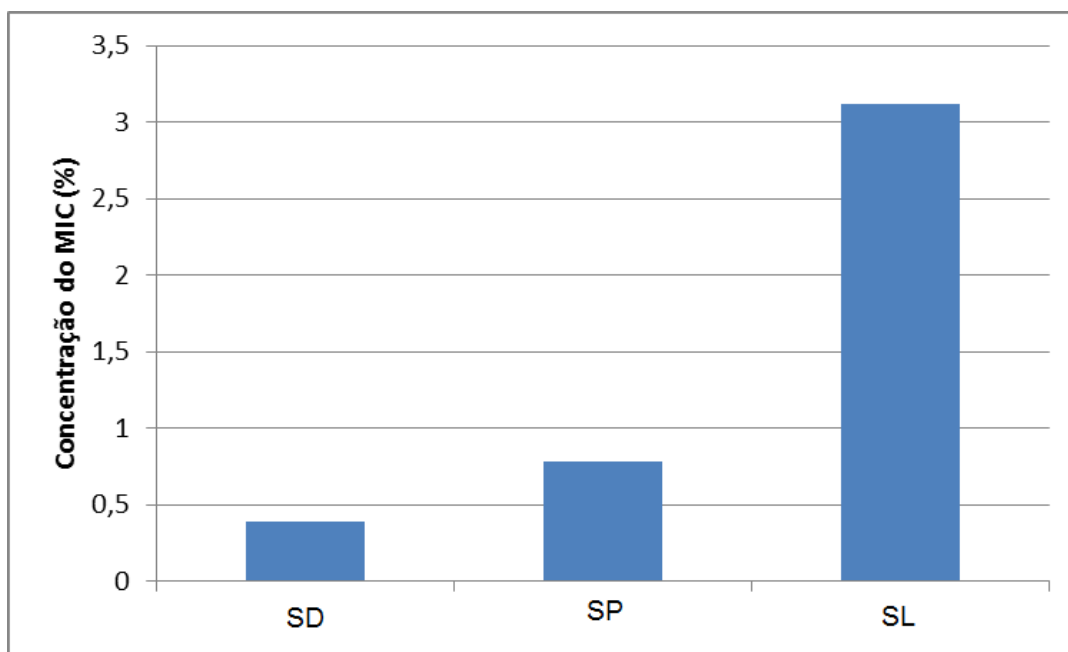
5.1 Determinação dos CIM's e medidas do pH:

Em relação ao pH das soluções utilizadas neste estudo, foram encontrados os seguintes valores: Água destilada: 7,2; Protex®: 5,4; Dettol®: 3,9; Lifebuoy®: 5,4.

O teste para análise da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado para cada solução desinfetante em três ocasiões distintas. Para o sabonete Dettol® foi encontrado o CIM na diluição 8, que se encontrava em 0,39% da concentração do sabonete. O CIM do sabonete Protex® foi encontrado na diluição 5, onde havia 3,12% da concentração do sabonete. Para o sabonete Lifebuoy® o CIM foi encontrado na diluição 7, que se encontrava a 0,78% da concentração do sabonete.

Na Figura 17 podemos observar a concentração inibitória mínima para cada sabonete e compará-la os grupos. No gráfico é possível observar que o sabonete Dettol® possui uma capacidade de inibir o crescimento do micro-organismo com uma menor concentração, comparado aos sabonetes Protex® e Lifebuoy®.

Figura 17 - Concentração dos CIM's de cada sabonete desinfetante.



Fonte: Elaboração própria

5.2 Capacidade de Formação de Biofilme:

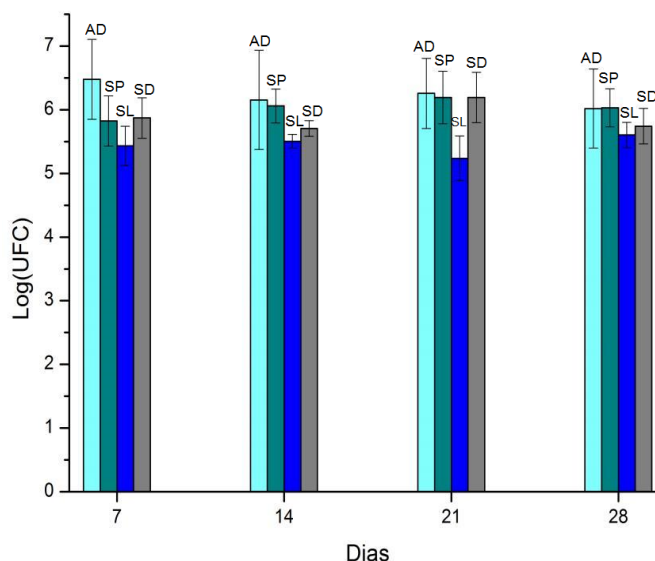
A Tabela 3 mostra os resultados de UFC no teste de ANOVA Mista Two-Way para avaliação dos fatores do estudo na fase de adesão (tempo 0). Segundo os resultados é possível afirmar que o tipo de sabonete ($p = 0,10802$) e o tempo ($p = 0,35087$) tiveram um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na capacidade da formação do biofilme. O efeito do tempo na capacidade da formação do biofilme foi influenciado pelo tipo de sabonete (ou vice-versa) como sugere a interação não significativa entre os dois fatores ($p = 0,58241$). Na Figura 18 temos o gráfico do experimento na fase de adesão, onde a contagem de UFC está representada em logaritmos, e é possível observar que não teve diferença no armazenamento dos corpos de prova nas diferentes soluções desinfetantes.

Tabela 3 - Teste de Anova Two-Way para capacidade de formação de biofilme 0 horas.

	DF	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	F Valor	P Valor
Grupos	3,00E+00	1,15E+12	384,353,000,000	206,557	0,10802*
Dias	3,00E+00	6,15E+11	205,068,000,000	110,207	0,35087*
Interação	9,00E+00	1,40E+12	1,56E+11	0,8381	0,58241
Modelo	1,50E+01	3,17E+12	211,455,000,000	113,639	0,33108
Erro	1,28E+02	2,38E+13	1,86E+11	--	--
Total	1,43E+02	2,70E+13	--	--	--

Fonte: Elaboração própria

Figura 18 - Concentração dos UFC/mL (log) de cada sabonete desinfetante, nos determinados períodos – Fase de adesão.



Fonte: Elaboração própria

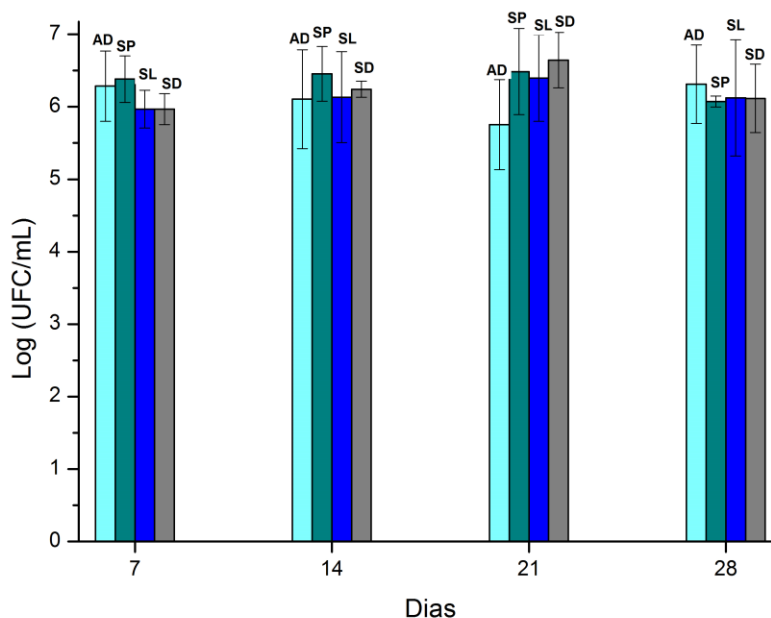
A Tabela 4 mostra os resultados de UFC no teste de ANOVA Mista Two-Way para avaliação dos fatores do estudo após 24 horas. Segundo os resultados é possível afirmar que o tipo de sabonete ($p = 0,02929$) teve um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na capacidade da formação do biofilme. Porém, o tempo ($p = 0,5757$) não teve um efeito estatisticamente significativo ($p > 0,05$) na capacidade de formação de biofilme. O efeito do tempo na capacidade da formação do biofilme não foi influenciado pelo tipo de sabonete (ou vice-versa) como sugere a interação não significativa entre os dois fatores ($p = 0,06133$). Na Figura 19 temos o gráfico do experimento após 24 horas, onde a contagem de UFC está representada em logaritmos, e é possível observar que não teve diferença no armazenamento dos corpos de prova nas as diferentes soluções desinfetantes.

Tabela 4- Teste de Anova Mista Two-Way para capacidade de formação de biofilme 24 horas.

	DF	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	F Valor	P Valor
Grupos	3	244,852	0,81617	309,551	0,02929*
Tempo	3	0,52518	0,17506	0,66395	0,5757
Interação	9	444,901	0,49433	187,487	0,06133
Modelo	15	74,227	0,49485	187,681	0,03125
Erro	128	3,374,896	0,26366	--	--
Total	143	4,117,166	--	--	--

Fonte: Elaboração própria.

Figura 19- Concentração dos UFC/mL (log) de cada sabonete desinfetante, nos determinados períodos- Experimento 24 horas.



Fonte: Elaboração própria

A Tabela 5 mostra os resultados proliferação celular por meio do teste alamarBlue® para a fase de adesão (tempo zero). Segundo os resultados é possível afirmar que o tipo de sabonete ($p = 0,022$) teve um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na capacidade da formação do biofilme, o que não ocorreu com o tempo de armazenamento ($p = 0,052$).

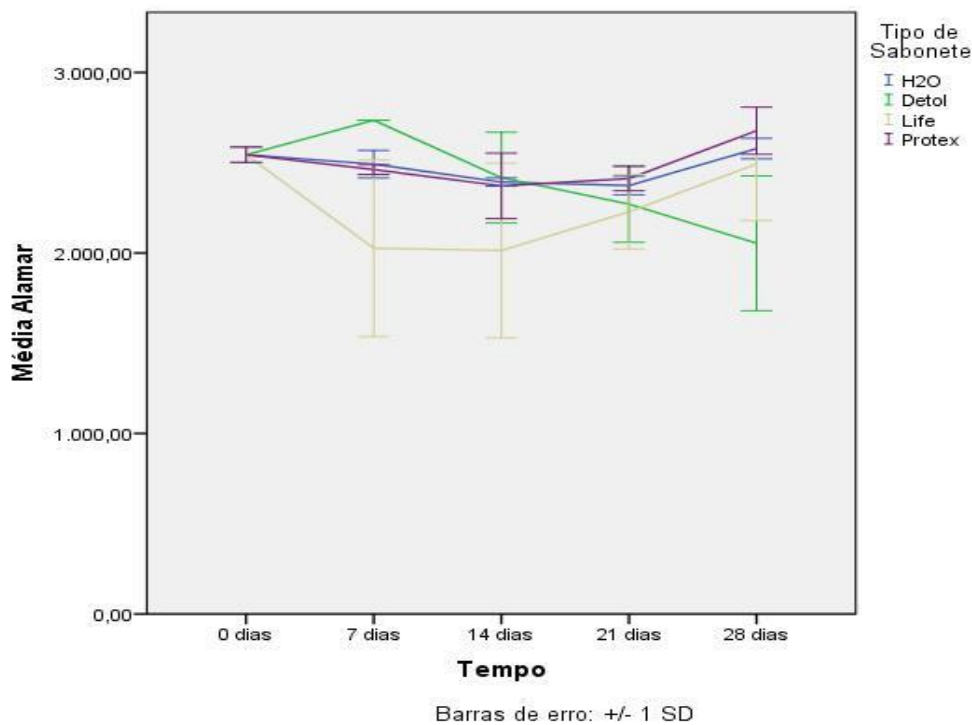
Além disso, segundo os resultados é possível afirmar que a interação do tipo de sabonete com o tempo ($p = 0,018$) teve um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na capacidade de formação de biofilme sobre a resina acrílica. A Figura 20 mostras os valores de fluorescência na fase de adesão em função do tipo de sabonete e tempo de armazenamento.

Tabela 5 - Teste de Anova Mista Two-Way para o teste alamarBlue® na fase de adesão.

Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	P	Potência
Grupos	502695,312	3	167565,104	3,579	0,022*	0,749
Tempo	483794,558	4	120948,640	2,584	0,052	0,674
Grupos x Tempo	1356434,875	12	113036,240	2,415	0,018*	0,913
Erro	1872563,722	40	46814,093			
Total	352366578,972	60				

Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 - Valores de fluorescência na fase de adesão em função do tipo de sabonete e tempo de armazenamento.



Fonte: Elaboração própria.

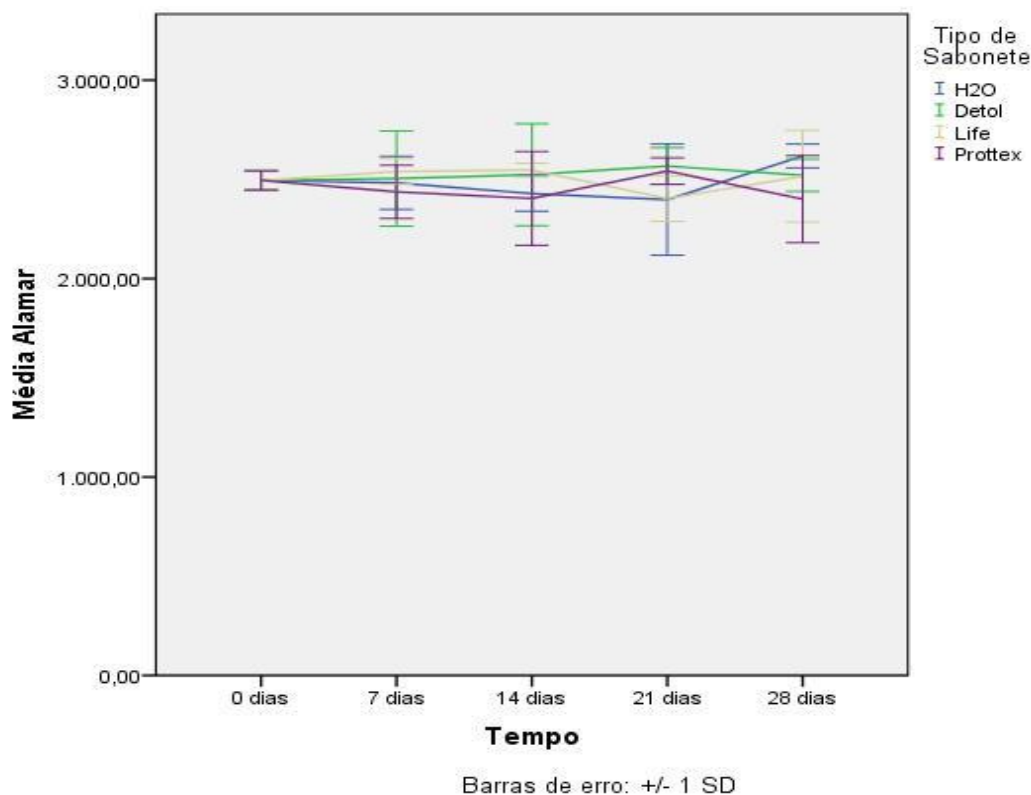
A Tabela 6 mostra os resultados do teste de ANOVA two-way para avaliação dos fatores de estudo. Segundo os resultados é possível afirmar que o tipo de sabonete ($p = 0,674$), o tempo ($p = 0,973$), e a interação do tipo de sabonete com o tempo de armazenamento ($p = 0,812$) não tiveram um efeito estatisticamente significativo ($p > 0,05$) na capacidade de formação de biofilme após 24 horas sobre a resina acrílica. A Figura 21 mostra os valores de fluorescência após 24 horas de formação do biofilme em função do tipo de sabonete e tempo de armazenamento.

Tabela 6 - Teste de Anova de dois fatores para o teste alamarBlue® após 24 horas de formação de biofilme.

Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	P
Grupos	35155,622	3	11718,541	0,516	0,674
Tempo	11203,159	4	2800,790	0,123	0,973
Grupos x Tempo	169209,063	12	14100,755	0,620	0,812
Erro	908995,037	40	22724,876		
Total	373326468,667	60			

Fonte: Elaboração própria.

Figura 21 - Valores de fluorescência após 24 horas de formação do biofilme em função do tipo de sabonete e tempo de armazenamento.



Fonte: Elaboração própria

5.3 Capacidade de redução de biofilme

O Teste de Kruskal-Wallis mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,014$) quando os diferentes grupos foram testados entre si. A Tabela 7 mostra as comparações múltipla de Dunn entre os diferentes grupos testados. A Tabela 8 mostra as medianas dos diferentes grupos testados. A Figura 22 mostra a distribuição dos dados dos diferentes grupos testados. Em resumo os resultados mostraram que todas as soluções foram efetivas em inibir o biofilme formado sobre as amostras de resina. Porém, SD e SL eliminaram totalmente o biofilme formado.

Tabela 7- Comparações múltipla de Dunn entre os diferentes grupos testados

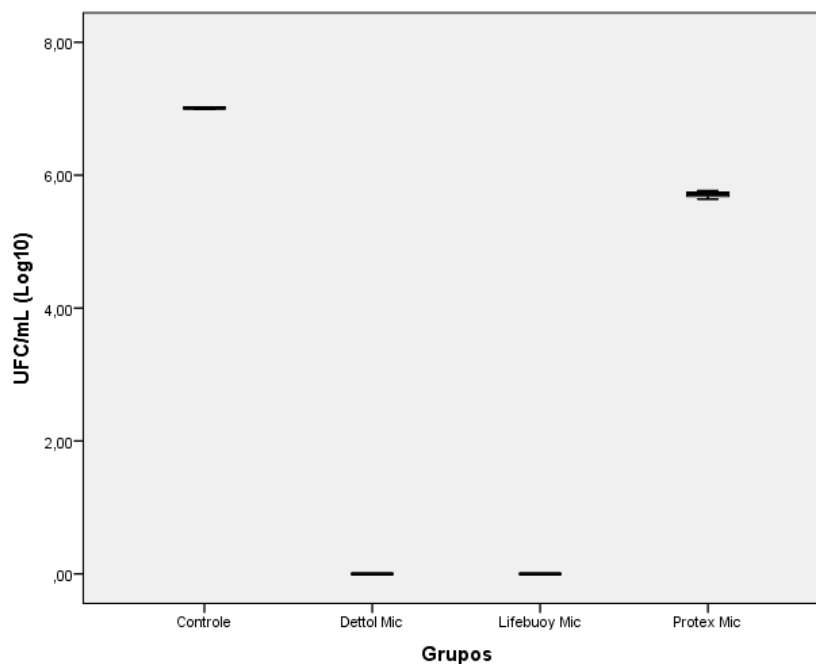
Comparação por grupos	p
SD - SL	1,000
SD - SP	0,616
SD - AD	0,039
SL - SP	0,616
SL - AD	0,039
SP - AD	1,000

Fonte: Elaboração própria

Tabela 8- Mediana dos diferentes grupos testados

Classificações			
	Grupos	N	Mean Rank
8 horas	AD	3	11,00
	SD	3	3,50
	SL	3	3,50
	SP	3	8,00
	Total	12	

Fonte: Elaboração própria

Figura 22- Gráfico Box-plot de distribuição dos dados dos diferentes grupos testados para avaliação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Fonte: Elaboração própria

5.4 Citotoxicidade

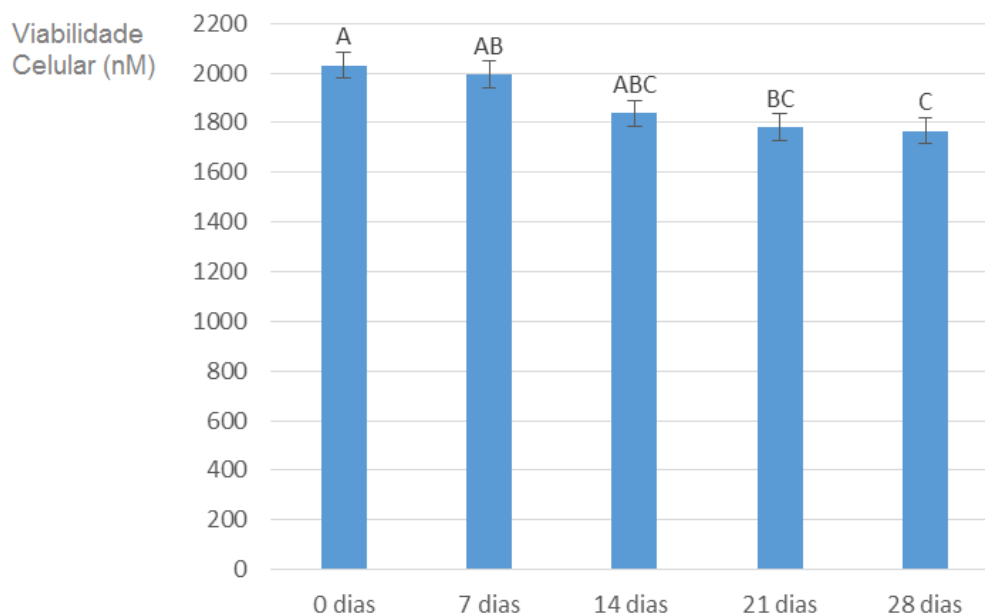
A Tabela 9 mostra os resultados do teste de ANOVA two-way para avaliação dos fatores de estudo. Segundo os resultados foi possível afirmar que o tipo de sabonete ($p=0,154$) não teve um efeito estatisticamente significativo. Entretanto, o tempo ($p=0,001$) teve um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na citotoxicidade da resina acrílica. Após um período de 21 e 28 dias de imersão nas soluções, a resina apresentou os menores valores de citotoxicidade, $\mu=1782,9\pm 52,5$ e $\mu=1766,8\pm 52,5$, respectivamente, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre esses tempos. Porém, quando comparados com o período de 0 dias ($\mu=2031,3\pm 52,5$) ambos grupos apresentaram uma diferença estatisticamente significativa. Finalmente, o efeito do tempo na citotoxicidade não foi influenciado pelo tipo de sabonete (ou vice-versa) como sugere a interação não significativa entre os dois fatores ($p=0,919$). A Figura 23 ilustra os resultados da análise quantitativa.

Tabela 9- Teste de Anova two-way para citotoxicidade

Variável dependente: Citotoxicidade					
Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.(p)
Entre os Grupos					
Solução	183345,750	3	61115,250	1,848	0,154
Tempo	717662,327	4	179415,582	5,424	0,001*
Dentro dos Grupos					
Solução * Tempo	187569,490	12	15630,791	0,473	0,919
Erro	1323011,792	40	33075,295		
Computado usando alfa = 0,05					

Fonte: Elaboração própria

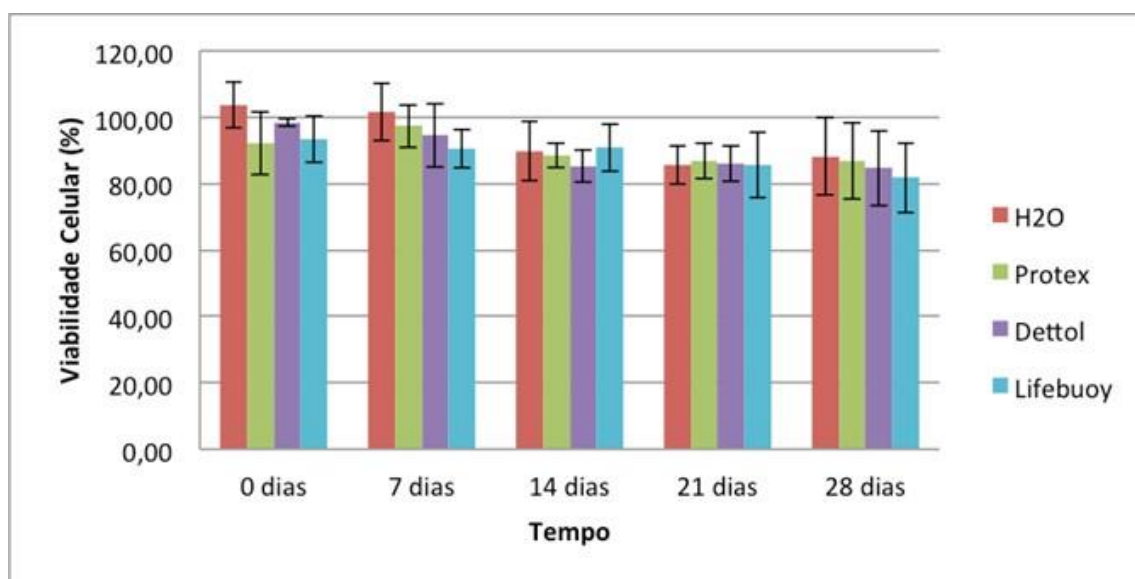
Figura 23- Viabilidade celular em relação ao tempo. As barras com letras diferentes representam diferença estatisticamente significativas de acordo com o teste de Bonferroni ($p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria

Por meio da análise qualitativa dos dados (Figura 24) foi possível observar que a resina acrílica após imersão nos sabonetes foi classificada como não citotóxica, pois apresentou inibição menor que 25% em relação ao grupo controle, independentemente do tempo de armazenamento.

Figura 24- Viabilidade celular dos sabonetes desinfetantes de acordo com o grupo controle.



Fonte: Elaboração própria

5.5 Rugosidade

A Tabela 10 mostram os resultados do teste de ANOVA dois fatores para avaliação do fator rugosidade. Observou-se que não existe uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para os efeitos principais ($p = 0,209$) e a interação (Grupo e Tempo; $p = 0,989$). A Tabela 11 mostra as médias e o desvio padrão de rugosidade para todos os grupos avaliados.

Tabela 10- Teste de Anova dois fatores para Rugosidade

Variável dependente: Rugosidade					
Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre os Grupos					
Grupo, Tempo	0,188	3	0,063	1,689	0,209
Erro	0,593	16	0,037		
Dentro dos Grupos					
Tempo	0,252	4	0,063	1,779	0,144
Grupo * Tempo	0,123	12	0,010	0,289	0,989
Erro	2,268	64	0,035		
Computado usando alfa =0,05					

Fonte: Elaboração própria

Tabela 11 - Médias e o desvio padrão de rugosidade para todos os grupos avaliados

Estatísticas descritivas				
	Grupos	Média	Desvio padrão	N
0 dias	AD	3,2864	0,21804	5
	SD	3,3178	0,29466	5
	SP	3,3100	0,17308	5
	SL	3,2556	0,21502	5
	Total	3,2924	0,21200	20
7 dias	AD	3,1891	0,16131	5
	SD	3,2533	0,28638	5
	SP	3,3282	0,11535	5
	SL	3,1296	0,14367	5
	Total	3,2251	0,18879	20
14 dias	AD	3,3189	0,33680	5
	SD	3,4544	0,13338	5
	SP	3,3136	0,10891	5
	SL	3,3096	0,17792	5
	Total	3,3491	0,20172	20
21 dias	AD	3,3438	0,10829	5
	SD	3,4236	0,22207	5
	SP	3,3991	0,10091	5
	SL	3,2891	0,18173	5
	Total	3,3639	0,15744	20
28 dias	AD	3,3064	0,08202	5
	SD	3,3560	0,19833	5
	SP	3,2282	0,13255	5
	SL	3,2233	0,14214	5
	Total	3,2785	0,14457	20

Fonte: Elaboração própria

5.6 Dureza

A Tabela 12 mostra os resultados do teste de ANOVA Mista Two-way para avaliação dos valores de dureza. Segundo os resultados é possível afirmar que o tipo de sabonete ($p = 0,003$) e o tempo de armazenamento ($p < 0,001$) tiveram um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na dureza da resina acrílica. Porém, o efeito do tempo na dureza não foi influenciado pelo tipo de sabonete (ou vice-versa) como sugere a interação não significativa entre os dois fatores ($p=0,107$).

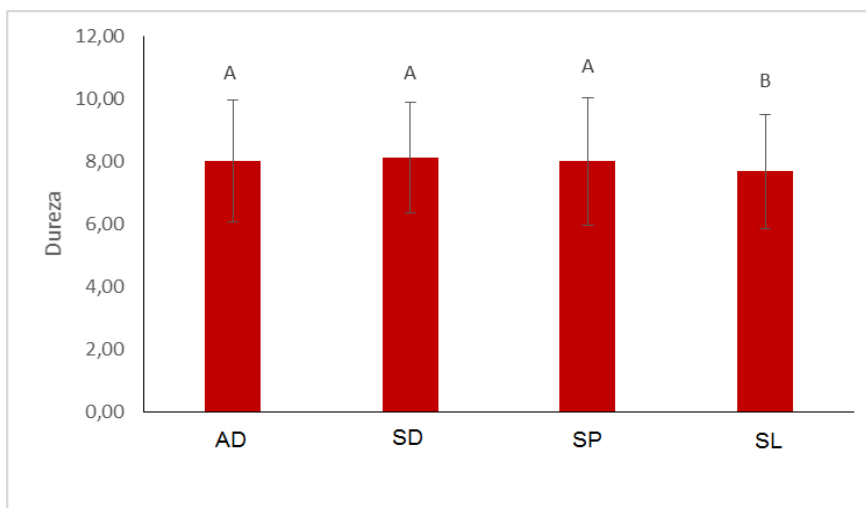
Pela análise da Figura 25 observa-se que o grupo do sabonete líquido Lifebuoy® (SL) ($\mu=7,70\pm 1,82$) apresentou os menores valores de dureza sendo estatisticamente diferente quando comparado com os outros grupos de estudo: AD ($\mu=8,04\pm 1,95$), SD ($\mu=8,13\pm 1,77$) e SP ($\mu=8,02\pm 1,82$). Na Figura 26 observa-se que, após um período de 21 e 28 dias, a resina apresentou os maiores valores de dureza, $\mu=9,41\pm 0,49$ e $\mu=9,33\pm 0,42$, respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa nestes tempos. Porém, quando comparados com os períodos de 0 ($\mu=4,51\pm 0,35$), 7 ($\mu=7,77\pm 0,30$) e 14 ($\mu=8,85\pm 0,49$) dias, ambos grupos (21 e 28 dias) apresentaram uma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 12- Teste de Anova Mista Two-Way para Dureza

Variável dependente: Dureza					
Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	Df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre os Grupos					
Grupos	2,654	3	0,885	6,978	0,003*
Erro	2,028	16	0,127		
Dentro dos Grupos					
Tempo	334,033	4	83,508	747,249	0,000*
Grupos*Tempo	2,177	12	0,181	1,624	0,107
Erro	7,152	64	10112		
Computado usando alfa = 0,05					

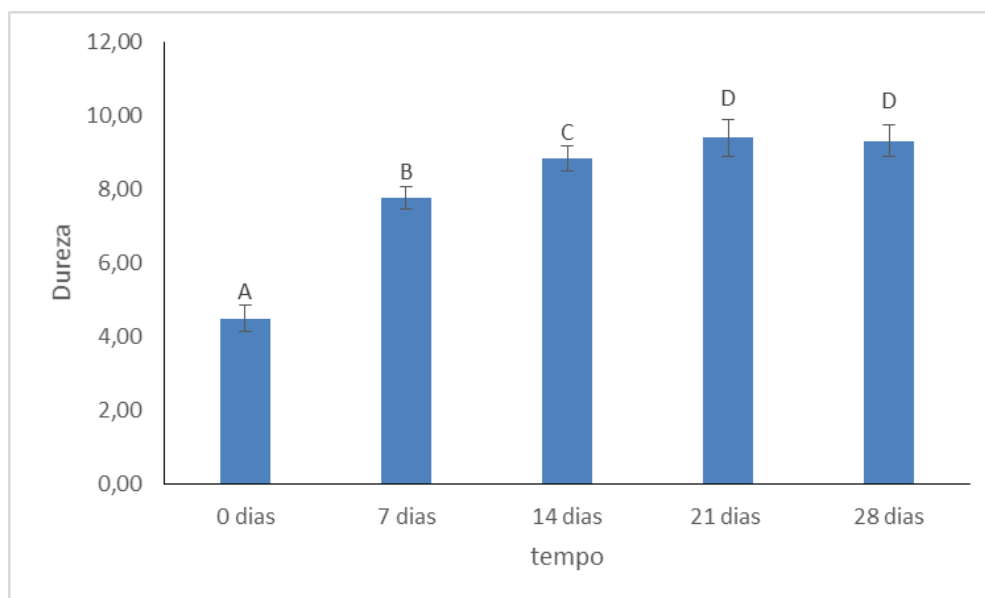
Fonte: Elaboração própria

Figura 25 - Dureza em relação ao tipo de sabonete. As barras com letras diferentes representam diferença estatisticamente significativas de acordo com o teste de Bonferroni ($p<0,05$)



Fonte: Elaboração própria

Figura 26- Dureza em relação ao tempo. As barras com letras diferentes representam diferença estatisticamente significativas de acordo com o teste de Bonferroni ($p < 0,05$)



Fonte: Elaboração própria

5.7 Alteração de cor:

A Tabela 13 mostra os resultados do teste de ANOVA Mista Two-way para avaliação da alteração de cor. Segundo os resultados é possível afirmar que o tipo de sabonete ($p = 0,003$) e o tempo ($p = 0,045$) tiveram um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na alteração de cor. O efeito do tempo na alteração de cor não foi influenciado pelo tipo de sabonete (ou vice-versa) como sugere a interação não significativa entre os dois fatores ($p=0,088$).

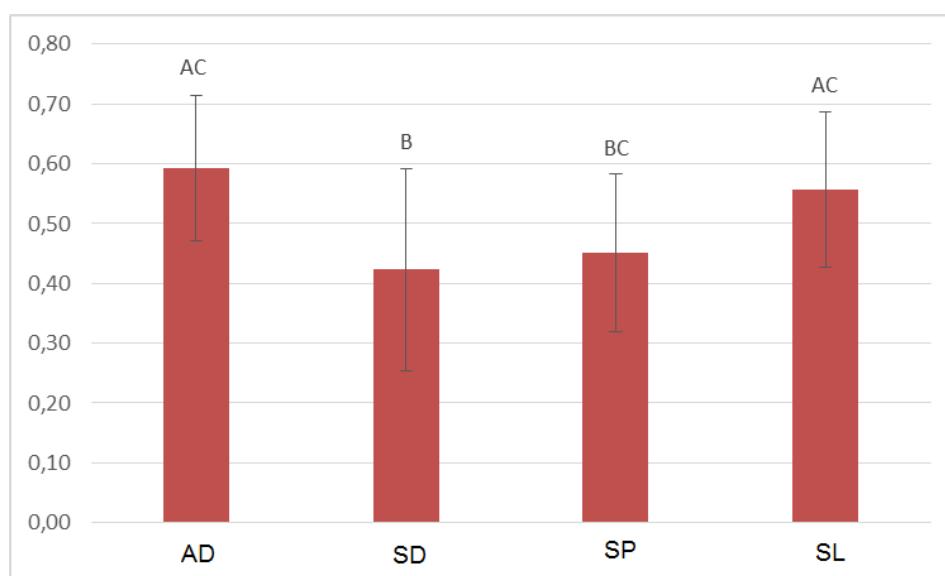
Tabela 13 - Teste de Anova Mista Two-Way para alteração de cor

Variável dependente: Alteração de Cor					
Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre os Grupos					
Grupos	0,397	3	0,132	7,182	0,003*
Erro	0,295	16	0,018		
Dentro dos Grupos					
Tempo	0,140	3	0,047	2,883	0,045*
Grupos*Tempo	0,265	9	0,029	1,824	0,088
Erro	0,775	48	0,016		
Computado usando alfa = 0,05					

Fonte: Elaboração própria

Na Figura 27 está representada a alteração de cor em relação ao tipo de sabonete. As barras com letras diferentes representam diferença estatisticamente significativas de acordo com o teste de Bonferroni ($p < 0,05$). As diferenças estatisticamente significativas para este fator, ocorre entre os Grupos AD e SD ($p = 0,007$) e, os Grupos AD e SP ($p = 0,029$). O grupo AD ($\mu = 0,59 \pm 0,12$) e o grupo SL ($\mu = 0,56 \pm 0,12$) apresentaram os maiores valores de alteração de cor, seguido pelo grupo SP ($\mu = 0,45 \pm 0,10$) e grupo SD ($\mu = 0,42 \pm 0,15$), os quais foram estatisticamente iguais entre si (Tabela 14).

Figura 27- Alteração de cor em relação ao tipo de sabonete. As letras diferentes representam diferença estatística significativa de acordo com o teste de Bonferroni ($p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria

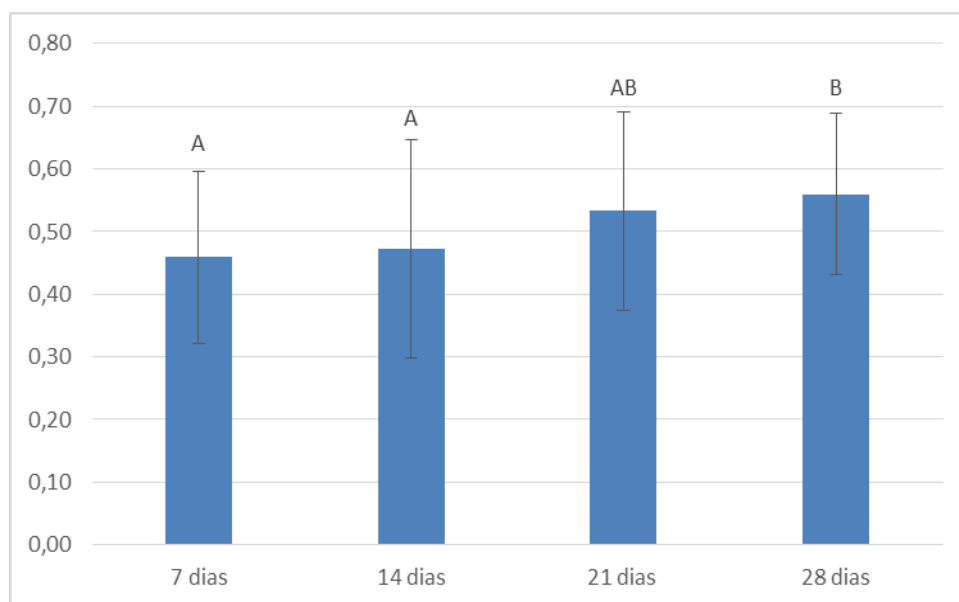
Tabela 14 - Dados Descritivos

Estatísticas descritivas				
Tempo	Grupos	Média	Desvio padrão	N
7 dias	AD	0,5253	0,08178	5
	SD	0,4820	0,13090	5
	SP	0,3238	0,09858	5
	SL	0,5038	0,15977	5
	Total	0,4587	0,13808	20
14 dias	AD	0,6298	0,13961	5
	SD	0,2918	0,14332	5
	SP	0,4378	0,14906	5
	SL	0,5303	0,06824	5
	Total	0,4724	0,17431	20
21 dias	AD	0,6382	0,08903	5
	SD	0,3776	0,13400	5
	SP	0,4943	0,07689	5
	SL	0,6208	0,17993	5
	Total	0,5327	0,15874	20
28 dias	AD	0,5751	0,15909	5
	SD	0,5415	0,18718	5
	SP	0,5501	0,09442	5
	SL	0,5732	0,08999	5
	Total	0,5599	0,12848	20

Fonte: Elaboração própria

Na Figura 28 está representada a alteração de cor em relação ao tempo. As barras com letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste de LSD ($p < 0,05$). Após um período de 28 dias a alteração de cor apresentou os maiores valores quando comparados com os períodos de 7 e 14 dias, sendo estatisticamente significativa ($p = 0,032$; $p = 0,023$; respectivamente). Porém, não apresentou diferença significativa quando comparado com o período de 21 dias ($p = 0,517$). Finalmente, o efeito do tempo na alteração de cor não foi influenciado pelo tipo de sabonete (ou vice-versa) como sugere a interação não significativa entre os dois fatores ($p = 0,088$).

Figura 28- Alteração de cor em relação ao tempo. As barras com letras diferentes representam diferença estatisticamente significativas de acordo com o teste de LSD ($p < 0,05$)



Fonte: Elaboração própria

A partir da análise qualitativa dos resultados desse estudo (Tabela 15), foi possível verificar que todos os valores de unidades de NBS ficaram entre 0,27 e 0,58 indicando alterações imperceptíveis ou leves para todos os grupos.

Tabela 15 - Relevância Clínica (NBS units)

Tempo	Grupos	Média	NBS
7 dias	AD	0,52	0,48
	SD	0,48	0,44
	SP	0,32	0,30
	SL	0,50	0,46
14 dias	AD	0,62	0,58
	SD	0,29	0,27
	SP	0,43	0,40
	SL	0,53	0,49
21 dias	AD	0,63	0,59
	SD	0,37	0,35
	SP	0,49	0,45
	SL	0,62	0,57
28 dias	AD	0,57	0,53
	SD	0,54	0,50
	SP	0,55	0,51
	SL	0,57	0,53

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

A estomatite protética é uma doença que se desenvolve, principalmente, quando micro-organismos colonizam a superfície interna da prótese (Darwazeh¹⁹ et al.¹⁹, 2010, Lazarin et al.⁴⁶, 2014, Dantas et al.¹⁸, 2014). Em decorrência de certas características das resinas acrílicas, como a aspereza, hidrofobicidade e forças eletrostáticas, a adesão desses micro-organismos é favorecida, resultando na formação do biofilme. (Salerno et al.⁸⁰, 2011, Hoshing et al.³³, 2011, Loster et al.⁵¹, 2012, Dandekeri et al.¹⁷, 2013, Hahnel et al.³¹, 2012, Huh et al.³⁴, 2014, Petrovic et al.⁷³, 2014). Estes biofilmes são extremamente resistentes aos agentes antimicrobianos em comparação com as células planctônicas, em função da matriz extracelular, a qual atua como um revestimento de proteção (Nett et al.⁶⁷, 2010, Faot et al.²³, 2014). A remoção eficaz do biofilme pela escovação exige um certo grau de destreza manual, que é comumente comprometida em idosos (Brondani et al.¹⁰, 2012). Assim, a desinfecção química associada ao método de escovação é considerado o procedimento mais indicado (Faot et al.²³, 2014; Felton et al.²⁵, 2011). Em função das desvantagens do uso de algumas soluções químicas utilizadas para a desinfecção de próteses, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas, mecânicas e física de uma resina acrílica para base de próteses após imersão em sabonetes líquidos desinfetantes, nas suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) para *Candida albicans*, em diferentes períodos de tempo.

Os sabões são sais de sódio de ácidos carboxílicos de cadeia longa, e esta estrutura molecular quando em contato com líquidos, dissolve-se interagindo com suas moléculas (München et al.⁶³, 2012). A forma líquida vem sendo largamente utilizada e sua produção subdivide-se entre sintéticos e naturais, com suas vantagens e desvantagens (UNIOESTE⁸⁷, 2009). Os sabonetes líquidos desinfetantes vêm sendo utilizado amplamente em função das suas características antimicrobianas, porém estudos sobre suas possíveis aplicações são muito escassos. Alguns estudos relatam o uso dos sabonetes desinfetantes para desinfecção de sondas de ultrassom (Koibuchi et al.⁴², 2013). Como por exemplo, o "Protex®" (Parker, Fairfield, NJ, EUA), que tem sido utilizado nos Estados Unidos, Hong Kong, Coréia do Sul, Venezuela e Emirados Árabes (Koibuchi et al.⁴², 2013). O uso de sabonetes desinfetantes poderia ser considerado uma maneira fácil e de baixo custo para desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais. Assim, o presente estudo é considerado importante, pois não há relatos na literatura com este propósito.

A partir das concentrações inibitórias encontradas, a capacidade de formação de biofilme sobre as amostras de uma resina acrílica para base de prótese foi avaliada em dois tempos: tempo 0, no qual foi considerada a fase de adesão do biofilme (90 minutos); e após 24 horas de formação. Além disso, dois testes foram realizados: a contagem de unidades formadoras de colônias e o teste alamarBlue®.

Para a fase de adesão, para ambos os testes, os resultados mostraram que o tipo de sabonete teve um efeito estatisticamente significativo na capacidade da formação do biofilme. Porém, o tempo de armazenamento não influenciou nessa propriedade. Tanto para contagem de células como na avaliação da proliferação celular, pode-se observar que os corpos de prova imersos na solução Lifebuoy®, nos primeiros dias de armazenamento, diminuíram a capacidade de formação de biofilme. Porém, houve aumento do biofilme após 28 dias de armazenamento. O Lifebuoy®, diferentemente dos demais sabonetes, apresenta na sua composição o linalol (álcool monoterpênico de cadeia aberta), um composto natural que expressa forte atividade antifúngica *in vitro* (Marcos-Arias et al.⁵⁵, 2011, Petrovic et al.⁷³, 2014). Porém, No teste alamarBlue®, as amostras imersas em Dettol® tiveram um comportamento inverso. Após 24 horas de formação do biofilme, tanto para a contagem de unidades formadoras de colônias quanto para o teste alamarBlue®, os resultados mostraram que nenhuma diferença foi encontrada entre as soluções, tendo ocorrido a formação do biofilme para todos os grupos. Além disso, o tempo de armazenamento não influenciou a capacidade de formação do biofilme.

Porém, de maneira geral, os resultados mostraram que as soluções dos sabonetes desinfetantes não foram capazes de inibir o crescimento do biofilme. O armazenamento das amostras nas soluções por longos períodos de tempo, principalmente em pH ácido, pode ter favorecido a degradação superficial das amostras em resina acrílica, aumentando sua área superficial. A degradação superficial pode formar nichos que servem como reservatórios de micro-organismos, favorecendo, assim, a adesão e proliferação das células fúngicas. Além disso, de acordo com Mwambete e Lyombe⁶⁴ (2011), os quais avaliaram os efeitos antimicrobianos dos chamados sabonetes medicamentosos por meio da avaliação da zona de inibição, a maioria dos sabonetes medicinais possuem atividade antibacteriana satisfatória e pouco efeito antifúngico.

Quando avaliada a capacidade de redução do biofilme após 8 horas de imersão nas soluções desinfetantes (imersão overnight), o grupo imerso em sabonete Protex® apresentou uma pequena redução do biofilme em comparação com o grupo controle (água

destilada), e os grupos imersos em sabonete Dettol® e Lifebuoy® eliminaram totalmente o biofilme existente nas superfícies das resinas acrílicas. Tal fato poderia ser explicado em função da composição dos materiais e da concentração dos seus componentes ativos. Como nenhum estudo foi encontrado na literatura a respeito da desinfecção de resinas acrílicas para base de próteses por meio da imersão em sabonetes líquidos desinfetantes, somente comparações indiretas poderão ser realizadas.

Várias são as substâncias químicas que conferem propriedades antimicrobianas para os produtos de higiene como sabonetes, cosméticos, dentifrícios, detergentes, desodorantes, sabões em pó e loções encontradas comercialmente e, especificamente, nas marcas e produtos utilizados neste experimento (Tabela 1). Porém, os fabricantes não citam as concentrações de cada componente dificultando, assim, o esclarecimento dos resultados obtidos no presente estudo. Dentre os componentes ativos presentes nos sabonetes utilizados podemos citar: EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), cocamidopropyl betaine, hidróxido de sódio, ácido cítrico e o triclocarban (que apresenta mecanismos de ação muito semelhantes ao triclosan).

O EDTA é um ingrediente solúvel em água usado como quelante em cosméticos e produtos de cuidados pessoais devido à sua capacidade de sequestrar íons metálicos, melhorando sua estabilidade. Finnegan S e Percival SL²⁷, 2015, relatam a capacidade do EDTA em desestabilizar os biofilmes por sequestro de cálcio, magnésio, zinco e ferro, tornando-o um agente adequado para inibição de biofilmes. Atualmente está sendo explorada a aplicação do EDTA, especificamente do tEDTA (EDTA tetrasódico) como um agente antimicrobiano e antibiótico autônomo, além da sua capacidade de combinação sinérgica com outros antimicrobianos, acarretando em uma abordagem "multidirecional" para o controle de biofilme (Finnegan S, Percival SL²⁷, 2015). Devine et al.²⁰, 2007 investigaram a utilidade do tEDTA para desinfecção de bases de próteses sobre espécies de *Candida*. Em 16 horas, o tEDTA reduziu a viabilidade de biofilme de bactérias salivares e de *C. albicans* em mais de 99% e removeu a maioria do biofilme da superfície do material. A exposição prolongada (6 dias) do material ao tEDTA teve o benefício adicional de reduzir a formação subsequente de biofilmes por micro-organismos salivares, embora a formação de biofilme por *C. albicans* não tenha sido afetada. No mesmo estudo, foi observado que o tEDTA não afetou a rugosidade superficial das amostras de resina acrílica para base de próteses.

Já o cocamidopropyl betaine é um surfactante utilizado nas formulações cosméticas, cuja principal função é desengordurar, desmanchando os óleos e gorduras.

Além disso, a betaína é também utilizada no tratamento de feridas infectadas como agente de limpeza. Neste aspecto, Minnich et al.⁵⁸, 2012 realizaram um estudo in vitro para examinar os efeitos antimicrobianos de uma solução contendo 0,1% de betaína e foi observada redução de 5,3 log a 5,8 log para vários micro-organismos, dentre eles a *Candida albicans*.

O hidróxido de sódio, presente na composição do Dettol® e Lifebuoy®, atua como solvente orgânico e de gordura. Além disso, este composto é capaz de neutralizar aminoácidos e degradar ácidos graxos, atuando de forma ativa na parede celular dos micro-organismos, o que lhe confere propriedade antimicrobiana (Estrela²², 2000). A presença desse componente nos sabonetes Dettol® e Lifebuoy® poderia explicar os melhores resultados em relação à eliminação do biofilme após 8 horas de imersão neste produto.

Em relação ao ácido cítrico, foi demonstrado que este produto pode ser utilizado como desinfetante de próteses, tendo sido eficaz na redução da viabilidade celular de *Candida albicans* em biofilme maduro (Faot et al.²³, 2014). É importante salientar que, de acordo com os fabricantes, o sabonete líquido Dettol® foi o único a apresentar o ácido cítrico na sua composição. Isso poderia estar associado com os melhores resultados obtidos em relação à eliminação do biofilme após 8 horas de imersão neste produto.

O agente antisséptico Triclocarban, presente no Protex®, apresenta amplo espectro (Ciancio e Panagakos, 2010), sendo efetivo contra bactérias gram negativas e gram positivas, bem como contra fungos e bolores. Ele apresenta boa tolerância para uso na pele e cavidade bucal quando em baixas concentrações. Em concentrações elevadas, atua como um biocida com múltiplos alvos citoplasmáticos e de membrana (Russell⁷⁸, 2004). No entanto, nas concentrações mais baixas (observadas em produtos comerciais) esse agente antimicrobiano mostrou-se efetivo contra bactérias, sendo desta forma, um agente bacteriostático, cujo alvo principal é a inibição da síntese dos ácidos graxos. O Triclocarban atravessa facilmente as membranas bacterianas e, uma vez dentro da célula, atua em uma enzima específica que a maioria das bactérias e fungos necessitam para sobreviver. Ao ligar-se à enzima bacteriana enoil-acil proteína-carreadora redutase (ENR) há um aumento da afinidade da enzima para o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺). Isto resulta na formação de um complexo ternário estável de ENR-NAD⁺-triclosan, que é incapaz de participar na síntese dos ácidos graxos (que são necessários para a construção e reposição de membranas celulares e para outras funções vitais bacterianas) provocando a morte da célula devido à desorganização da membrana.

Como já mencionado, estudos semelhantes não foram encontrados na literatura, impossibilitando comparações diretas. Além disso, os fabricantes não revelam a concentração de cada um dos seus componentes. Dessa forma, a discussão dos resultados aqui obtidos é baseada em suposições e estudos são necessários para identificar os componentes presentes em cada sabonete desinfetante, bem como suas concentrações.

Quanto à citotoxicidade, os resultados do presente estudo demonstraram que não houve diferença significativa em relação à viabilidade celular da resina acrílica após imersão nos diferentes grupos experimentais. Desta forma, a princípio, o uso destas soluções para a desinfecção de próteses por imersão noturna não causaria efeito citotóxico nas células da mucosa oral. Porém, o tempo de imersão influenciou significativamente na citotoxicidade da resina acrílica. Após 21 dias, houve diminuição do metabolismo celular em decorrência do tempo prolongado de imersão, independentemente do tipo de solução testada. Este aumento na citotoxicidade não parece estar relacionado à ação direta dos componentes da formulação dos sabonetes sobre as células, uma vez que esse aumento também foi observado para o grupo imerso em água destilada. Bettencourt et al.⁹, 2010, em uma revisão de literatura, relataram que uma consequência clinicamente significativa da biodegradação de resinas acrílicas é a liberação de monômeros e aditivos tóxicos não ligados a partir da rede de polímeros. Os compostos libertados podem ter um efeito tóxico na cavidade oral. Estudos com base em células indicam que esses produtos da biodegradação da resina acrílica (MMA e derivados, ftalatos, formaldeído) têm o potencial de induzir citotoxicidade, genotoxicidade, alteração na expressão de citocinas, de fatores de crescimento e stress oxidativo em células permanentes e primárias. Porém, por meio da análise qualitativa dos dados foi possível observar que a resina acrílica após imersão nos sabonetes foi classificada como não citotóxica, pois apresentou inibição menor que 25% em relação ao grupo controle, independentemente do tempo de armazenamento.

Temos na literatura que as propriedades mecânicas das resinas acrílicas usadas em próteses intra-orais podem ser alteradas em caso de exposição frequente a líquidos, tais como bebidas e enxaguantes bucais (Goiato et al.²⁹, 2014) pois, quando colocadas num ambiente aquoso, as resinas acrílicas conseguem absorver uma pequena quantidade de água através de difusão. Essas moléculas de água penetram na matriz da resina e posicionam-se entre as cadeias do polímero, causando um ligeiro aumento volumétrico, o que interfere no emaranhamento da cadeia e altera as características físicas do polímero (Rawlf⁷⁶, 2005). Alguns autores sugerem também que a termociclagem é capaz de promover

contrações e expansões sucessivas do material, levando à sua degradação (Goiato et al.²⁸, 2013). Estes fatos poderiam estar associados ao aumento da liberação de monômeros pelo material em função do tempo, acarretando em alterações das propriedades bem como no aumento da citotoxicidade. Além disso, conhecendo o caráter ácido das soluções e lembrando que as resinas acrílicas são solúveis em baixo pH, pode ter havido, ao longo do tempo, alteração na ligação dos polímeros, tornando-os mais suscetíveis à degradação. Este fenômeno pode afetar negativamente a resistência ao desgaste, a dureza, e a integridade superficial devido ao “amolecimento” da matriz (Villalta et al.⁹¹, 2006, Patel et al.⁷¹, 2004) o que nos permite inferir que provocando alterações em suas propriedades físicas e mecânicas poderia, por consequência, afetar também as propriedades biológicas.

A adesão parece ser mais importante do que a retenção mecânica para a colonização por microorganismos (Dandekeri et al.¹⁷, 2013). Porém, existem vários relatos que sugerem a relação entre a rugosidade superficial e a adesão de *Candida albicans* nas resinas acrílicas que compõem as próteses. Verran e Maryan⁹⁰ (1997) reportaram que é significativamente maior o número de *Candida albicans* em superfícies rugosas do que em superfícies lisas e há relatos na literatura de que a adesão de *Candida albicans* também é significativamente maior em superfícies ásperas do que em superfícies lisas (Radford et al.⁷⁴, 1998; Huh et al.³⁴, 2014). Dessa forma, a rugosidade é também uma importante propriedade a ser avaliada, uma vez que irregularidades presentes nas superfícies dos materiais que compõem as próteses removíveis parciais ou totais podem agir como reservatórios de microorganismos (da Silva et al.¹⁶, 2008). Os resultados deste estudo demonstraram que não houve diferença nos valores de rugosidade para nenhum dos grupos em questão, concordando com os resultados de Machado et al.⁵³, 2012, os quais também observaram que a rugosidade de uma resina acrílica para base de próteses não foi alterada pela imersão em água ou em soluções desinfetantes. De acordo com os autores, a estabilidade do material pode ser devido à sua estrutura polimérica reticulada formada a partir de uma reação térmica de polimerização, na qual ocorre alto grau de conversão de monômero em polímero, tornando o material mais estável (Vallittu et al.⁸⁸, 1995). Por outro lado, alguns estudos reportaram alteração da rugosidade superficial das amostras de resina após processos de desinfecção (da Silva et al.¹⁶, 2008, Machado et al.⁵², 2009). A diferença entre os resultados poderiam ser explicadas em função do tipo de soluções utilizadas, lembrando

que o presente estudo foi o primeiro a propor a desinfecção de próteses por imersão em sabonetes líquidos desinfetantes, dificultando a comparação direta com outros estudos.

Em relação à dureza, os resultados mostraram que essa propriedade foi alterada pelo tipo de sabonete e pelo tempo de imersão da resina acrílica. Observou-se que somente as amostras imersas no sabonete líquido Lifebuoy® apresentaram os menores valores de dureza sendo estatisticamente diferente quando comparado com os outros grupos de estudo. As demais soluções, água destilada, Dettol® e Protex® não alteraram os valores de dureza da resina acrílica para base de prótese. As diferenças entre as soluções poderiam ser explicadas pela composição dos sabonetes desinfetantes. Alguns componentes podem agir como solventes na superfície das resinas, sendo considerados potenciais fontes de danos (Neppelenbroek et al.⁶⁶, 2005). Como já dito, os valores de dureza permaneceram inalterados para a maioria das soluções. Esses resultados estão de acordo com Machado et al.⁵², 2009, que avaliaram os efeitos da desinfecção por micro-ondas e soluções químicas sobre a dureza de duas marcas de resina acrílica reembasadoras e uma para base de prótese polimerizada pelo calor. Em relação à resina acrílica para base de prótese, os resultados mostraram que a dureza não foi alterada significativamente após qualquer método de desinfecção.

Em relação ao tempo de armazenamento, foi possível observar que, após um período de 21 e 28 dias, a resina apresentou os maiores valores de dureza, não havendo diferença estatisticamente significativa nestes tempos. Somente comparações indiretas com outros estudos podem ser feitas, pois nenhum estudo a respeito das possíveis alterações que sabonetes líquidos podem ocasionar em resinas acrílicas foi encontrado na literatura. Neste contexto, os resultados deste estudo estão de acordo com os de Neppelenbroek et al.⁶⁶, 2005, os quais verificaram que os valores médios da dureza de duas resinas acrílicas para bases de próteses demonstraram um significativo aumento após 15 dias de imersão em água e esse aumento foi continuado até 60 dias.

Os resultados do presente estudo são contraditórios aos resultados de Panariello et al.⁷⁰, 2015, os quais observaram diminuição da dureza de uma resina acrílica para base de prótese após armazenamento em hipoclorito de sódio por um período de 45 dias. Da mesma forma, Goiato et al.²⁸ (2013) verificaram que os valores de dureza de todos os grupos experimentais reduziram após período de 60 dias de armazenamento. As diferenças poderiam ser explicadas em função dos diferentes períodos de armazenamento, uma vez que, em nosso estudo, as amostras ficaram imersas nas soluções por no máximo 28 dias. A

princípio, as moléculas de água quando são absorvidas pela resina agem como plastificantes, resultando na clivagem de ligações e deterioração gradual da sua infraestrutura (Smith e Hunter⁸⁵, 2008). Além disso, o teor de monômero residual pode afetar adversamente as propriedades mecânicas da prótese, em função do efeito plastificante imediatamente após a polimerização. Com o armazenamento em longos períodos de tempo, a liberação do monômero residual do interior dos materiais poliméricos podem contribuir para o aumento dos valores de dureza (Neppelenbroek et al.⁶⁶, 2005).

No presente estudo, também pudemos observar a partir da análise dos resultados que o tipo de sabonete e o tempo tiveram um efeito significativo na alteração de cor da resina acrílica. Por outro lado, o efeito do tempo na alteração de cor não foi influenciado pelo tipo de sabonete (ou vice-versa) como sugere a interação não significativa entre os dois fatores. Em relação ao tipo de solução, diferenças foram encontradas entre os grupos imersos em água destilada e sabonete Dettol® e entre os grupos imersos em água destilada e sabonete Protex®. O grupo imerso em água destilada e em sabonete Lifebuoy® apresentaram os maiores valores de alteração de cor, seguidos pelo grupo imerso em sabonete Protex® e grupo imerso em sabonete Dettol®. O principal mecanismo para a alteração de cor é a absorção de líquidos. Quando a resina absorve água, sua matriz polimérica se expande, separando as cadeias poliméricas, permitindo o manchamento ou a descoloração do material. As moléculas de água quando são absorvidas pela resina agem como plastificantes, resultando na clivagem de ligações e deterioração gradual da sua infraestrutura (Smith e Hunter⁸⁵, 2008). Sendo assim, a alteração de cor nos grupos água destilada e sabonete Dettol® poderia ser explicada pela absorção de água, dissolução dos componentes e degradação dos pigmentos intrínsecos da resina (Hollis et al.³², 2015). Além disso, o pH do meio pode ter influenciado na descoloração da resina, uma vez que a acidez pode acarretar em uma superfície mais rugosa, favorecendo o manchamento (Bagheri et al.⁶, 2005). Outro fato importante a ser considerado é que o álcool pode também favorecer o manchamento por causar um amolecimento da matriz da resina. O pH e a composição química dos diferentes sabonetes desinfetantes poderiam explicar a diferença encontrada em relação à estabilidade de cor. Porém, os mecanismos pelos quais ocorrem a alteração de cor não podem ser exatamente conhecidos, podendo ser somente estimados. Os resultados aqui descritos estão de acordo com os achados de Panariello et al.⁷⁰ (2015), os quais observaram alteração de cor de uma resina acrílica termopolimerizável após imersão em soluções

desinfetantes (hipoclorito de sódio, Corega Tabs, gluconato de clorexidina e ácido peracético).

Em relação ao tempo, os resultados mostraram que, após um período de 28 dias, a alteração de cor apresentou os maiores valores quando comparado com os períodos de 7 e 14 dias. Porém, não apresentou diferença significativa quando comparado com o período de 21 dias. Resultados similares foram encontrados no estudo desenvolvido por Panariello et al.⁷⁰ (2013), no qual houve diferenças significativas na alteração de cor de uma resina acrílica termopolimerizável após 21 dias de imersão em soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio, Corega Tabs, gluconato de clorexidina e ácido peracético). Da mesma forma, Goiato et al.²⁸ (2013) verificaram que a termociclagem associada ao processo de desinfecção com diferentes soluções (Efferdent, clorexidina e hipoclorito de sódio) produziu alterações significativas da cor em amostras de resinas acrílicas. Porém, os valores obtidos ficaram dentro dos parâmetros clinicamente aceitáveis. Para Moffa et al.⁵⁹ (2011) a estabilidade da cor dos materiais dentários é uma variável a ser considerada diante da escolha de métodos de desinfecção, apesar da estabilidade de cor também sofrer influência do tempo, independentemente da desinfecção com produtos químicos. Para padronizar os resultados de diferentes trabalhos, o Sistema de Unidades NBS é comumente utilizado. Esse sistema permite a conversão dos dados de ΔE em valores de relevância clínica. Para a conversão dos valores, a seguinte fórmula foi utilizada: $NBS\ units = \Delta E * X\ 0,92$. Os valores obtidos entre 0,0 e 0,5 indicam que a alteração de cor é imperceptível. Entre 0,5 a 1,5 a alteração é leve. Valores entre 1,5 e 3,0 indicam uma alteração perceptível. A alteração de cor é considerada significativa quando os valores estão entre 3,0 e 6,0 unidades de NBS e considerada grande quando os valores estão entre 6,0 e 12,0 unidades. Nos valores acima de 12,0 a alteração de cor é considerada muito grande. A partir da análise dos resultados desse estudo foi possível verificar que todos os valores de unidades de NBS ficaram entre 0,27 e 0,58 indicando alterações imperceptíveis ou leves para todos os grupos.

Diante dos resultados obtidos, é possível relatar que os sabonetes líquidos poderiam ser uma alternativa para desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais, levando em consideração sua efetividade na redução do biofilme e sua não citotoxicidade. Deve-se considerar também que os valores de rugosidade, dureza e alteração de cor após imersão nas soluções desinfetantes, de maneira geral, apresentaram o mesmo comportamento da imersão em água. Porém, vários estudos são necessários para

estabelecer um protocolo de desinfecção para orientação dos usuários de próteses, incluindo estudos clínicos.

7 CONCLUSÃO

Para todos os tipos sabonetes foram encontradas concentrações inibitórias mínimas para *Candida albicans* em altas diluições, o que demonstra a eficácia dos mesmos para esse propósito. Apesar dos resultados encontrados nos testes de capacidade de formação de biofilme após diferentes períodos de imersão não apresentarem diferença significativa, sendo observada a formação do biofilme para todos os grupos, todas as soluções foram eficazes quando testamos a capacidade de reduzir o biofilme da superfície dos corpos de prova de resina acrílica após 8 horas de imersão, sendo que o Dettol® e o Lifebuoy® eliminaram totalmente o biofilme formado. Outro resultado positivo deste estudo foi a classificação dos três sabonetes como não citotóxicos além de não promover alteração na rugosidade das amostras. Apenas o sabonete Lifebuoy® diminuiu significativamente os valores de dureza e produziu maior efeito na alteração de cor das resinas acrílicas, mas de acordo com a relevância clínica, para todos os grupos, as alterações encontradas foram classificadas como imperceptíveis ou leves.

Necessitamos de novos estudos para estabelecer um protocolo clínico de desinfecção, que seja seguro para os pacientes e que não diminua a vida útil das próteses. Pelos resultados demonstrados até o momento, podemos afirmar que essas soluções são promissoras para tal finalidade, além de serem de simples acesso para a população, possuírem baixo custo e se apresentarem eficazes contra o biofilme de *Candida albicans* sem causar prejuízos para o material de confecção das próteses.

REFERÊNCIAS*

1. Abe S, Ishihara K, Adachi M, Okuda K. Oral hygiene evaluation for effective oral care in preventing pneumonia in dentate elderly. *Arch Gerontol Geriatr.* 2006; 43(1): 53-64.
2. Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers: review of the literature. *Gerodontology.* 1985; 1(5): 202-6.
3. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH et al. Eradication of a mature methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. *Braz Dent J.* 2013;24(5):487-91.
4. Arendorf T, Walker D. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987; 14(3): 217-27.
5. Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effects of various disinfectant solutions on the surface hardness of an acrylic resin denture base material. *Int J Prosthodont.* 1993; 6(1):9-12.
6. Bagheri R, Burrow MF, Tyas M. Influence of food-simulating solutions and surface finish on susceptibility to staining of aesthetic restorative materials. *J Dent* 2005; 33(5):389-98.
7. Barnabé W, Mendonça T, Neto A, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(5): 453–9.
8. Bell JA, Brockmann SL, Feil P, Sackuvich DA. The effectiveness of two disinfectants on denture base acrylic resin with an organic load. *J Prosthet Dent.* 1989; 61(5):580-3.
9. Bettencourt AF, Neves CB, Almeida MS, Pinheiro LM, Arantes e Oliveira S, Lopes L, et al.. Biodegradation of acrylic based resins: a review. *Dent Mater.* 2010;(26):171–80.
10. Brondani MA, Samim F, Feng H. A conventional microwave oven for denture cleaning: a critical review. *Gerodontology.* 2012; 29(2):6-15.
11. Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000; 28(2):141-9.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

12. Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol.* 1981; 10(2):65-80.
13. Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979;42(6):619-23.
14. Campanha NH, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE, Machado AL, Giampaolo ET. The effect of long-term disinfection procedures on hardness property of resin denture teeth. *Gerodontology.* 2012;29(2): 571-6.
15. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001;183(18): 5385–94.
16. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ho CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008;17(8):627-33.
17. Dandekeri S, Prasad K, Shetty M, Hegde C, Sowmya MK, Jagadeesh M. Occurrence of streptococcus and *Candida* species and salivary pH in patients wearing complete denture. *Int J Health Rehabil Sci.* 2013;2(4):198-203.
18. Dantas APFM, Consani RLX, Sardi JCO, Mesquita MF, Silva MCVS, Sinhoreti MAC. Biofilm formation in denture base acrylic resins and disinfection method using microwave. *J Res Pract Dent.* 2014; 2014: 112424
19. Darwazeh AMG, Al-Dwairi ZN, Al-Zwairi AA. The Relationship between tobacco smoking and oral colonization with *Candida* species. *J Contemp Dent Pract.* 2010; 1;11(3):017-24.
20. Devine DA1, Percival RS, Wood DJ, Tuthill TJ, Kite P, Killington RA, et al. Inhibition of biofilms associated with dentures and toothbrushes by tetrasodium EDTA. *J Appl Microbiol.* 2007;103(6):2516-24.
21. Dorocka-Bobkowska, B.; Budtz-Jorgensen, E.; Wloch, S. Non-insulin dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Pathol Med.* 1996; 25(8):411-5.
22. Estrela CRA. Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares. [Dissertação de Mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2000.

23. Faot F, Cavalcanti YW, Bertolini MM, Pinto LR, Silva WJ, Del Bel Cury AA. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methylmethacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. *BMC Oral Health*. 2014;14:77.
24. Farzana K. Comparative bactericidal activity of various soaps against gram-positive and gram-negative bacteria. *Sci Res Essays*. 2011; 6(16): 3514-8.
25. Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S et al. Evidence based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Prosthodont*. 2011; 20 Suppl 1:S1-S12.
26. Feltrin PP, Tortamano N, Jaeger RG, Araújo VC. Estomatite protética: estudo da superfície interna da prótese total em microscopia eletrônica de varredura e da mucosa de suporte através de exame citológico, histopatológico e imunohistoquímico. *Rev Assoc Bras Odontol*. 1993; 1(1): 31-8.
27. Finnegan S, Percival SL. EDTA: an antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;1;4(7):415-21.
28. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology* 2013; 30(4):276-82.
29. Goiato MC, Dos Santos DM, Andreotti AM, Nobrega AS, Moreno A, Haddad MF, et. al. Effect of beverages and mouthwashes on the hardness of polymers used in intraoral prostheses. *J Prosthodont*. 2014; 23(7):559-64.
30. Gomes PN, da Silva WJ, Pousa CC, Narvaes EA, Del Bel Cury AA. Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida albicans glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. *Arch Oral Biol*. 2011;56(11):1274–81.
31. Hahnel S, Rosentritt M, Burgers R, Handel G, Lang R. *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology* 2012; 29(2):383-91.
32. Hollis S, Eisenbeisz E, Versluis A. Color stability of denture resins after staining and exposure to cleansing agents. *J Prosthet Dent*. 2015;114(5):709-14.
33. Hoshing C, Dixit S, Mootha A, Diwan N. Role of *Candida albicans* in denture stomatitis. *J Indian Acad Oral Med Radiol*. 2011;23:617-9.

34. Huh JB, Lim Y, Youn HI, Chang BM, Lee JY, Shin SW. Effect of denture cleansers on *Candida albicans* biofilm formation over resilient liners. *J Adv Prosthodont* 2014; 6(2):109-14.
35. Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc.* 1992; 123(1):46–51.
36. International Organization for Standardization. International standard ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices. 1992. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO; 1992.
37. Izumida FE, Jorge JH, Ribeiro RC, Pavarina AC, Moffa EB, Giampaolo ET. Surface roughness and *Candida albicans* biofilm formation on a reline resin after long-term chemical disinfection and toothbrushing. *J Prosthet Dent.* 2014; 112(6):1523-9.
38. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(3):203-7.
39. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007;24(1):52-7.
40. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of time of storage in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int,* 2009; 40(10):e93-100.
41. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(3): 340-4.
42. Koibuchi H, Kotani K, Taniguchi N. Ultrasound probes as a possible vector of bacterial transmission. *Med Ultrason.* 2013;15(1):41-4.
43. Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil.* 1997;24(10): 788–90.
44. Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil.* 2002; 29(3):300-4.

45. Larson E, Lin SX, Gomez-Duarte C, Della-Latta P. Effect of antibacterial home cleaning and handwashing products on infectious disease symptoms. *Ann Int Med*. 2004;140(5):321-9.
46. Lazarin AA, Zamperini CA, Vergani CE, Wady AF, Giampaolo ET, Machado AL. *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an in vitro study. *Gerodontology*. 2014;31(1): 25–33.
47. Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont*. 1995; 8(2):122-8.
48. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent* 1994; 72(6):644-50.
49. Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent.*, 1994; 71(2): 178-85.
50. Levy SB. Antibacterial household products: cause for concern. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):512–5.
51. Loster BW, Loster J, Wieczorek A, Ryniewicz W. Mycological analysis of the oral cavity of patients using acrylic removable dentures. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012:951572.
52. Machado AL, Breeding LC, Vergani CE, da Cruz Perez LE. Hardness and surface roughness of reline and denture base acrylic resins after repeated disinfection procedures. *J Prosthet Dent*. 2009;102(2):115-22.
53. Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE. Surface roughness of denture base and reline materials after disinfection by immersion in chlorhexidine or microwave irradiation. *Gerodontology*. 2012;29(2):375-82.
54. Mahonen K, Virtanen K, Larmas M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. *J Oral Rehabil*. 1998; 25(4):304–10.
55. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindos G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med* 2011;11:119.
56. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28.
57. McCourtie J, MacFarlane TW, Samaranayake LP. Effect of chlorhexidine gluconate on the adherence of *Candida* species to denture acrylic. *J Med Microbiol*. 1985;20(1):97-104.

58. Minnich KE, Stolarick R, Wilkins RG, Chilson G, Pritt SL, Unverdorben M. The effect of a wound care solution containing polyhexanide and betaine on bacterial counts: results of an in vitro study. *Ostomy Wound Manage.* 2012;58(10):32-6.
59. Moffa EB, Giampaolo ET, Izumida FE, Pavarina AC, Machado AL, Vergani CE. Colour stability of relined dentures after chemical disinfection. A randomised clinical trial. *J Dent.* 2011;39 Suppl 3:e65-71.
60. Moffa EB, Mussi MC, Xiao Y, Garrido SS, Machado MA, Giampaolo ET et al. Histatin 5 inhibits adhesion of *Candida albicans* to reconstructed human oral epithelium. *Front Microbiol.* 2015; 28;6:885.
61. Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfectants in infection control. *Dent Clin North Am.* 1991; 35(2):323-37.
62. Morgan TD, Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(1):47-53.
63. München S. Sabonete líquido: uma abordagem para a Química Orgânica. In: Anais do 16º ENEQ e 10º EDUQUI; 2012; Salvador, BA [anais eletrônicos]. Salvador: UFBA; 2012. [acesso em 01 de março de 2017]. Disponível em: [<https://portalseer.ufba.br/index.php/anaiseneq2012/article/view/7862/5687>].
64. Mwambete KD, Lyombe F. Antimicrobial activity of medicated soaps commonly used by dar es salaam residents in tanzania. *Indian J Pharm Sci.* 2011; 73(1):92–8.
65. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008; 35(11): 836–46.
66. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. *J Prosthet Dent* 2005; 93(2):171-6.
67. Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun* 2010; 78(9):3650-9.
68. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999; 12(2):153-9.

69. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5421-6.
70. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effects of short-term immersion and brushing with different denture cleansers on the roughness, hardness, and color of two types of acrylic resin. *Am J Dent.* 2015; 28(3):150-6.
71. Patel SB, Gordan VV, Barrett AA, Shen C. The effect of surface finishing and storage solutions on the color stability of resin-based composites. *J Am Dent Assoc.* 2004; 135(5):587-94.
72. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(5):532-6.
73. Petrovic M, Kostic M, Kostic M, Krunic N, Igic M, Pesic Z, et al. Therapeutic alternatives of natural compounds in treatment of Candida-associated denture stomatitis. *Acta Med Medianae* 2014;53:73-9.
74. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent.* 1998; 26(7):577-83.
75. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.*; 2012; 2012:528521.
76. Rawlf HR. Dental polymers. In: Anusavice KJ, editor. *Phillips dental materials 11th ed.* Philadelphia: Saunders; 2005. p. 135-57
77. Rodney D, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167–93.
78. Russell AD. Whither triclosan?. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53 (5): 693–5.
79. Sagripanti JL, Bonifacino A. Cytotoxicity of liquid disinfectants. *Surg Infect.* 2000; 1(1):3-14.
80. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16(2):e139-43.
81. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. Relationships between denture base resin cytotoxicity and cell lipid metabolism. *Int J Prosthodont.* 1995; 8(6): 580-6.

82. Sepúlveda-Navarro WF, Arana-Correa BE, Borges CP, Jorge JH, Urban VM, Campanha NH. Color stability of resins and nylon as denture base material in beverages. *J Prosthodont.* 2011;20(8):632-8.
83. Sham AS, Chu FC, Chai J, Chow TW Color stability of provisional prosthodontic materials. *J Prosthet Dent.* 2004; 91(5):447-52.
84. Sheridan, PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1997;10(1): 73-7.
85. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol.* 2008;57(pt 8):966-73.
86. U.S. Food and Drug Administration Alert. FDA public Health. Notification: Denture Cleanser Allergic Reactions and Misuse. February 14, 2008. [acesso em 01 de março de 2017]. Disponível em: [wayback.archive-it.org/7993/20170111190517/http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotifies/PublicHealthNotifications/ucm062012.htm]
87. UNIOESTE. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Sabonetes Líquidos: fabricando sabonetes líquidos. Projeto Gerart. Volume VIII, 22p. 2009. Disponível em: [http://projetos.unioeste.br/projetos/gerart/apostilas/apostila8.pdf]. [acesso em 01 de março de 2017].
88. Vallittu PK, Miettinen V, Alakuijala P. Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dent Mater.* 1995; 11(6):338-42.
89. Veres EM, Wolfaardt JF, Hnizdo E. Denture cleansers: part I – a survey of material and methods employed by denture wearers. *J Dent Assoc South Africa.* 1985; 40(10): 591–4.
90. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997; 77(5): 535–9.
91. Villalta P, Lu H, Okte Z. Effects of staining and bleaching on color change of dental composite resins. *J Prosthet Dent.* 2006; 95(2):137-42.
92. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part.1. Factors influencing distribution of *Cândida* species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998; 43(1): 45-50.

93. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management : a review. Part.2. Oral diseases caused by Candida species. Aust Dent J. 1998; 43(3): 160-6.
94. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management a review. Part.3. Treatment of oral candidosis. Aust Dent J. 1998; 43(4): 244-9.
95. Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad, L. A method for toxicity screening oh biomaterials using cells cultured on Millipore Filters. J Biomed Mater Res. 1979; 13(1): 109-20.
96. Wiegand C, Hipler UC. Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2008;3(1):Doc12.
97. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011; 3: 3087208.
98. Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal Candida. Mycoses. 2010; 53(3): 221–6.
99. Zissis A, Yannikakis S, Harrison A. Comparison of denture stomatitis prevalence in two population groups. Int J Prosthodont. 2006;19(6): 621–5.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)
Araraquara, 16 de Março de 2017.

Jacqueline de Oliveira Zoccolotti