



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



*Beatriz Helena Dias Panariello*

**Eficácia da imersão e da escovação mecânica combinada  
com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução  
da viabilidade de biofilme multiespécies.**

Araraquara

-2013-



UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



*Beatriz Helena Dias Panariello*

**Eficácia da imersão e da escovação mecânica combinada com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução da viabilidade de biofilme multiespécies.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral- Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

Araraquara

-2013-

Panariello, Beatriz Helena Dias

Eficácia da imersão e da escovação mecânica combinada com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução da viabilidade de biofilme multiespécies. / Beatriz Helena Dias Panariello.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

81 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

1. Biofilmes 2. Desinfetantes 3. Escovação dentária 4. Resinas  
acrílicas I. Título

*Beatriz Helena Dias Panariello*

**Eficácia da imersão e da escovação mecânica combinada  
com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução  
da viabilidade de biofilme multiespécies.**

**COMISSÃO JULGADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

2º examinador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

3º examinador: Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva

Araraquara, 20 de março de 2013.

## *Dados curriculares*

### *Beatriz Helena Dias Panariello*

#### **NASCIMENTO**

16/02/1987- São Paulo, SP

#### **FILIAÇÃO**

Cibele Mara Dias Panariello e Fábio Leonardo Panariello.

#### **2006 – 2010**

Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

#### **2008**

Iniciação científica na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

#### **2009**

Iniciação científica na disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

#### **2010**

Bolsista do projeto de extensão denominado “Programa de manutenção da saúde bucal em pacientes de 3ª idade usuários de Prótese Parcial Removível”- Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

#### **2011 – 2013**

Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

#### **2011**

Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível I.

#### **2012**

Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II.

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho:*

A **Deus**, por ter me dado o dom da vida e uma família tão maravilhosa, por caminhar sempre ao meu lado, iluminando meus passos, e por todas as bênçãos concedidas.

Aos meus pais, **Cibele e Fábio**, meus maiores incentivadores, por todo amor, carinho e afeto em minha criação. Por acreditarem em mim e dedicarem todos seus esforços para que eu tivesse uma boa formação tanto intelectual quanto pessoal. Pelas noites mal dormidas quando eu estava doente, triste ou com medo. Pelos conselhos, abraços, risadas, pelas lições... E por fazerem de tudo para tornar meus sonhos em realidade. Vocês são meus exemplos de vida. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos, **Fabrizio e Thaís**, meus companheiros e confidentes. Por sempre apoiarem minhas decisões e por se orgulharem da irmã mais velha. Estar com vocês traz paz ao meu coração. Amo vocês!

Ao meu namorado, **Éder**, por compreender minhas ausências para realizar este trabalho, por entender meu cansaço e mesmo assim me apoiar, me incentivar e não deixar com que nada me abalasse. Por me ajudar a superar obstáculos com amor e compreensão, e por estar sempre ao meu lado com um lindo sorriso. Meu companheiro, amigo, amor da minha vida!

*Muito obrigada!*

## *Agradecimentos especiais*

À minha orientadora, **Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo**, um exemplo de competência científica, pela confiança depositada, pela paciência em me ensinar e pela dedicação em fazer com que meu mestrado fosse concluído com êxito. Sinto-me orgulhosa por ter tido a oportunidade de ser orientada pela senhora!

À **Fernanda Izumida**, uma amiga querida e a quem considero minha segunda orientadora, por ter me ensinado tudo que sei a respeito de microbiologia, ajudando-me a fazer o projeto sair do papel.

Obrigada pela dedicação e, principalmente, pela paciência e carinho em me ensinar!

Ao **Eduardo Moffa**, por todas as dicas e paciência em me explicar procedimentos burocráticos e também o funcionamento de aparelhos essenciais à minha pesquisa. Pelas ajudas no laboratório, pela companhia nos almoços, pelo ânimo enquanto trabalhávamos. Por ser parte fundamental de uma equipe que me ajudou a chegar até aqui.

À **Érica**, técnica do laboratório e querida amiga, por ter me ensinado com muita paciência todos os procedimentos laboratoriais, desde o funcionamento da autoclave até a confecção de meios de cultura. Por ter me ajudado de livre e espontânea vontade, com um sorriso no rosto, mesmo tendo tantas coisas para fazer.

À família do meu namorado, que me acolheu como uma filha, em especial à **Magda, Lina, Clari e Cátia**, pelo carinho, apoio, afeto, amizade e compreensão durante esta jornada.

Aos meus companheiros de mestrado, em especial à **Bruna, Bia, Chaiene, Camilo, Fernanda Alves e Fernanda Vargas**, pela amizade, pelo apoio, pelas risadas e pelo acolhimento nas horas difíceis e às amigas que estão no doutorado, **Sabrina e Cris**, pela amizade, carinho e ajuda nesta fase tão importante.

E aos professores da disciplina de Prótese Parcial Removível, **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina**,  
**Profa. Dra. Ana Lúcia Machado**, **Profa. Dra. Janaína Habib Jorge** e **Prof. Dr. Carlos Eduardo**  
**Vergani** por todas as sugestões, ensinamentos, confiança e acolhimento durante o curso de  
Mestrado.

*Muito obrigada!*



## *Agradecimentos*

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, na pessoa da diretora **Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon**, e da vice-diretora, **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

Aos docentes do **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, pelos ensinamentos para minha vida acadêmica e apoio na execução da minha pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, em especial à **Martinha**, pelo carinho comigo e pela eficiência em seus serviços.

Aos funcionários da **Biblioteca**, pelos auxílios na normatização deste trabalho.

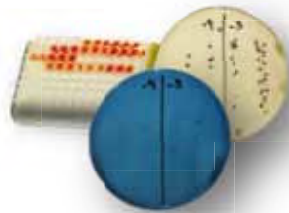
À **Raíssa**, técnica do laboratório, pelas ajudas concedidas.

Aos funcionários da **Seção de Pós-Graduação** desta Faculdade, pelos serviços e esclarecimentos prestados durante este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da minha bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo auxílio financeiro concedido, necessário ao bom andamento desta pesquisa.

**E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos!**



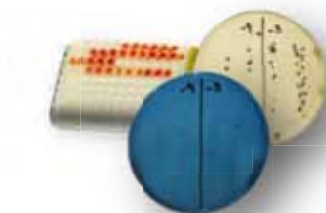
*Resumo*

Panariello BHD. Eficácia da imersão e da escovação mecânica combinada com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução da viabilidade de biofilme multiespécies [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

## Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia da escovação com diferentes agentes de limpeza para reduzir a viabilidade de um biofilme multiespécies em resinas acrílicas. Amostras de Lucitone 550 (L) e Tokuyama Rebase Fast II (T) (10 mm x 2 mm) foram preparadas, esterilizadas e inoculadas com uma suspensão de  $10^7$  células/mL de *Candida albicans* e *Candida glabrata* e de  $10^8$  células/mL de *Streptococcus mutans*. As amostras foram incubadas por 48 h a 37 °C para a formação do biofilme. Em seguida, foram divididas (n = 12) e submetidas à escovação ou imersão durante 10 s nas soluções: água destilada (A); ácido peracético 0,2% (Ac), digluconato de clorexidina 1% (Chx), solução água/dentífrico 1:1 (D), hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) e perborato de sódio (Pb). Os microrganismos viáveis foram avaliados por ensaio de XTT e contagem de colônias (ufc /mL). Os dados foram verificados por ANOVA e teste de Tukey com nível de significância de 5%. Neste estudo, a eficácia da remoção do biofilme foi aumentada pela escovação combinada com agentes químicos de limpeza, por outro lado, a imersão por 10 s em AC e NaOCl mostrou-se tão eficaz quanto a escovação em L e T. Este resultado é bastante interessante, pois a imersão nestes agentes de limpeza por um curto período poderia ser uma alternativa viável para a desinfecção de próteses de pacientes com dificuldades motoras para executar a escovação.

**Palavras-chave:** Biofilmes; Desinfetantes; Escovação Dentária; Resinas Acrílicas.



*Abstract*

Panariello BHD. Effectiveness of immersion and mechanical brushing combined with different denture cleansers in reducing viability of multispecies biofilm. [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

## **Abstract**

The aim of this study was to investigate the efficacy of brushing with different cleaning agents in reducing the viability of multispecies biofilm in acrylic resins. Lucitone 550 (L) and Tokuyama Rebase Fast II (T) specimens (10 mm x 2 mm) were prepared, sterilized and inoculated with a *Candida albicans* and *Candida glabrata* suspension of  $10^7$  cells/mL and a suspension of  $10^8$  cells/mL of *Streptococcus mutans*. Specimens were incubated for 48 h at 37°C for the biofilm formation. Then, they were divided (n=12) and subjected to brushing or immersion for 10 s in the solutions: distilled water (W), 0.2% peracetic acid (Ac), 1% chlorhexidine digluconate (Chx), 1:1 water/dentifrice solution (D), 1% sodium hypochlorite (NaOCl) and sodium perborate (Pb). Viable microorganisms was evaluated by XTT assay and colony counts (cfu/mL). Data were performed by ANOVA and Tukey test with 5% significance level. In this study, the efficacy of biofilm removal was increased by brushing combined with chemical cleaning agents, on the other hand, immersion for 10 sec in NaOCl and AC has shown to be as effective as brushing for L and T. This result is quite interesting, inasmuch as immersion in these cleaning agents for a short period could be a viable alternative for prostheses disinfection of patients with motor disabilities to perform the brushing.

**Keywords:** Biofilms; Disinfectants; Toothbrushing; Acrylic Resins.

# *Sumário*

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3	PROPOSIÇÃO.....	41
4	MATERIAL E MÉTODO.....	43
4.1	MATERIAIS.....	43
4.2	INSTRUMENTOS.....	44
4.3	APARELHOS.....	44
4.4	MÉTODO.....	45
4.4.1	Distribuição dos grupos.....	45
4.4.2	Confecção dos corpos de prova.....	46
4.4.3	Medida da rugosidade superficial.....	47
4.4.4	Esterilização dos corpos de prova.....	48
4.4.5	Inóculos e meios.....	48
4.4.6	Formação do biofilme.....	48
4.4.7	Ensaio de escovação.....	49
4.4.8	Grupos experimentais.....	50
4.4.9	Ensaio de XTT.....	51
4.4.10	Contagem do número de colônias viáveis.....	52
4.5	Planejamento estatístico.....	53
5	RESULTADO.....	55
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICE.....	77



# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

As próteses removíveis, parciais e totais são consideradas fatores predisponentes para o desenvolvimento da estomatite protética, uma vez que podem bloquear o fluxo de anticorpos da saliva e a ação mecânica de limpeza da língua. A elevada ocorrência de estomatite protética em usuários de próteses, sobretudo idosos, tem sido demonstrada em vários estudos<sup>1, 21, 26, 84, 93</sup>. As manifestações clínicas dessa infecção variam desde não sintomáticas até dor severa com dificuldades para se alimentar<sup>95, 88</sup>.

Embora a *Candida albicans* seja a espécie mais prevalente na estomatite protética, outras espécies do mesmo gênero tais como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida dubliniensis* também têm sido isoladas e associadas ao desenvolvimento de infecções orais<sup>1, 31, 47, 79</sup>. A candidíase oral é uma infecção oportunista comum em indivíduos debilitados e a *Candida glabrata* é a segunda espécie mais frequentemente isolada nesta condição, depois da *Candida albicans*<sup>50</sup>. Coco et al.<sup>28</sup> (2008) associaram a formação de biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. glabrata* com a ocorrência da estomatite, indicando que a *C. glabrata* pode desempenhar um papel importante nessa patogênese. Além desses, outros micro-organismos, como *Streptococcus mutans* também são encontrados nos biofilmes presentes nas próteses<sup>63</sup>. A interação do gênero *Candida* com outros micro-organismos pode determinar sua virulência<sup>71</sup>.

Os tratamentos direcionados à estomatite protética são variados, podendo incluir terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses. A escovação associada a algum tipo de detergente, sabão ou dentífrico é o método utilizado pela maioria dos usuários de próteses removíveis<sup>2, 13, 29</sup>. No entanto, a eficácia da escovação, isoladamente, é considerada um dos métodos menos eficientes<sup>25, 42</sup>. A associação de agentes químicos de limpeza à escovação mecânica pode ser necessária nos indivíduos com idade avançada e deficiências motoras e/ou visuais<sup>8, 19, 34</sup>. Webb et al.<sup>92</sup> (1998), Kulak et al.<sup>42</sup> (1997) e Paranhos et al.<sup>66</sup> (2009) verificaram que o controle do biofilme da prótese com a associação de agentes de limpeza é mais efetivo quando comparado com a escovação somente. Os meios químicos de limpeza ou desinfecção consistem na imersão das próteses em soluções que apresentam ações solvente, detergente, bactericida e fungicida. Dentre elas destacam-se os peróxidos alcalinos, hipocloritos, ácidos, desinfetantes e enzimas<sup>19, 44, 64</sup>.

A utilização de hipoclorito de sódio, apesar de efetiva para desinfecção, vem sendo limitada devido ao seu efeito deletério como corrosão dos componentes metálicos das próteses e alteração de cor da base acrílica<sup>86</sup>. O mecanismo de ação antimicrobiano da clorexidina é bem conhecido<sup>9, 10, 89</sup>. Entretanto, esta solução apresenta alguns efeitos adversos, entre eles manchamento, alteração da cor dos dentes artificiais e da base de prótese e alteração do paladar<sup>10, 34, 85</sup>. Além disso, a clorexidina pode alterar a dureza superficial de resinas acrílicas expostas a períodos prolongados de imersão<sup>5, 6</sup>. Os compostos a base de peróxido alcalino geralmente apresentam-se sob a forma de pó ou tablete, que liberam oxigênio quando em contato com a água, promovendo assim uma limpeza mecânica na prótese, além de exercerem alguma ação antimicrobiana<sup>2, 15, 64, 68</sup>. Todavia, existe grande controvérsia



sobre os efeitos que estes materiais podem causar às resinas ou às superfícies metálicas das próteses. Backenstose, Wells<sup>7</sup> (1977) e Robinson et al.<sup>76</sup> (1985) não observaram danos às resinas ou aos metais, enquanto Bates, Smith<sup>12</sup> (1965) e Langwell<sup>45</sup> (1955) verificaram clareamento da resina acrílica, além da possibilidade de efeitos nocivos aos tecidos de suporte em decorrência dos resíduos de peróxido infiltrados na resina.

Desinfetantes à base de ácido peracético têm sido usados na indústria de alimentos, na descontaminação e esterilização de equipamentos médicos e hospitalares termo sensíveis. O ácido peracético a 0,2% é um potente microbicida que age através de uma reação de oxidação das ligações SS (pontes de sulfeto) e SH (ligações de hidrogênio-sulfeto) presentes na membrana celular, citoplasma e material genético (DNA/RNA) dos micro-organismos, quebrando ligações vitais e destruindo-os. Apresenta efeito rápido e é eficaz contra bactérias, vírus, fungos e esporos em concentrações abaixo de 0,5%, mesmo na presença de proteínas<sup>46</sup>. Ao contrário da maioria dos desinfetantes químicos, não se torna inativo na presença de matéria orgânica. Embora relativamente citotóxico<sup>80</sup>, este desinfetante não deixa resíduo e não produz subprodutos prejudiciais, porque seu mecanismo de ação envolve a liberação de oxigênio livre e radical de hidroxila decomposto em oxigênio água e ácido acético<sup>78</sup>. Em função dessas características, o ácido peracético tem sido usado na área da saúde para a descontaminação de água potável em substituição ao hipoclorito de sódio<sup>54</sup>, na esterilização de instrumental odontológico<sup>24</sup>, na desinfecção de canais radiculares<sup>49</sup> e na descontaminação de resinas acrílicas<sup>27</sup>. De acordo com Chassot et al.<sup>27</sup> (2006), a imersão em ácido peracético por pelo menos 5 minutos foi eficaz na desinfecção de resinas acrílicas contaminadas tanto com saliva humana quanto com *Bacillus subtilis* ou *Bacillus stearothermophilus*.

Os estudos de desinfecção química de resinas acrílicas aqui mencionados têm focado seus objetivos em protocolos de imersão para avaliar a eficácia de inativação de micro-organismos e efeitos sobre as propriedades dos materiais, entretanto, pesquisas que avaliaram desinfecção de próteses utilizando soluções desinfetantes associadas à escovação ainda são escassas. Desta forma, objetivo deste estudo é avaliar a eficácia da imersão e da escovação combinada com imersão em agentes de limpeza na inativação de biofilme multiespécies em resinas acrílicas.



# *Revisão da literatura*

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Em 1974, Budtz-Jorgensen<sup>18</sup> discutiu a significância da *C. albicans* na patogenia da estomatite protética. Segundo o autor, a presença de prótese na cavidade bucal é considerada o fator predisponente primário para o desenvolvimento da estomatite protética. A infecção por *C. albicans* deveria ser reconhecida como uma complicação comumente associada à utilização de próteses removíveis, parciais ou totais. Em indivíduos saudáveis, a estomatite protética causada por *Candida* não é considerada uma condição patológica séria, porém, em pacientes debilitados, a candidose bucal pode evoluir para quadros de infecções sistêmicas, principalmente quando são pacientes submetidos a terapias prolongadas com antibióticos, corticosteroides ou medicamentos imunossupressores. Os efeitos patogênicos das espécies de *Candida* são atribuídos à degradação da superfície epitelial pela ação de enzimas e ao desenvolvimento de resposta hipersensitiva tardia. Além disso, as endotoxinas produzidas pelas espécies de *Candida* podem agravar as lesões decorrentes da estomatite protética. Considerando a significância das espécies de *Candida* na estomatite protética, o autor concluiu que seria necessária a adoção de medidas que previnam a colonização destes micro-organismos na mucosa palatina e nas próteses, como limpeza adequada das próteses, cuidados com a higiene bucal, eliminação de traumas locais e remoção das próteses no período noturno.

Bassiouny et al.<sup>9</sup>, em 1975, realizaram um estudo duplo cego cruzado avaliando o efeito da escovação com gel contendo digluconato de clorexidina a 1% na redução do índice de placa, índice de inflamação gengival, índice de cálculo e na profundidade de sondagem de bolsas periodontais. Foram selecionados 49 pacientes usuários de próteses removíveis. Os participantes foram divididos em 2 grupos: GA) realizaram escovação com gel contendo digluconato de clorexidina a 1% nas primeiras 6 semanas e escovação com gel placebo nas 6 semanas seguintes e GB) realizaram escovação com géis invertidos. Os pacientes foram avaliados antes, durante e após a finalização do experimento. Os resultados mostraram que em relação ao índice de placa e ao índice de inflamação gengival, houve uma redução estatística significativa com o uso do gel contendo clorexidina comparado ao grupo placebo. Entretanto, em relação ao índice de cálculo e profundidade de sondagem não houve diferença estatística significativa entre os grupos. No final do estudo, alguns pacientes relataram reações adversas e manchamentos nos dentes com o uso da clorexidina. Os autores concluíram que o uso da clorexidina foi efetivo na prevenção da formação de biofilme e como agente terapêutico no tratamento da gengivite.

Bonesvoll<sup>17</sup>, em 1977, verificou que a molécula de Clorexidina tem propriedades lipofílicas e hidrofílicas, e o equilíbrio entre elas é importante para a atividade antimicrobiana. A capacidade de fixação da clorexidina na cavidade oral é muito grande. Experimentos in vitro mostraram que a clorexidina fica adsorvida às superfícies dentárias e mucinas salivares e, em seguida, é liberada muito lentamente sob a forma ativa. O efeito inibidor da formação de biofilme pela ação da clorexidina pode ser baseado na sua retenção e subsequente desprendimento lento na cavidade oral.

No mesmo ano, Case<sup>23</sup> realizou uma revisão de literatura sobre a segurança da utilização de clorexidina. A clorexidina é uma bisguanidina e uma base muito forte, formulada com um sal solúvel

em água. Sua absorção é baixa no trato gastrointestinal quando a droga é ingerida. Estudos de longa duração (dois anos) em ratos mostram não haver a presença de tumores ou quaisquer outros sinais tóxicos na avaliação histológica dos tecidos. Não foram relatados efeitos teratogênicos. A molécula de clorexidina é uma molécula grande que não é degradada no metabolismo. Com base nesses dados, o autor afirmou ser possível a utilização de formulações contendo clorexidina por longos períodos, ou até durante toda a vida, nos protocolos preconizados para seres humanos, uma vez que a clorexidina apresenta um nível de toxicidade extremamente baixo.

Ainda em 1977, Backenstose, Wells<sup>7</sup>, realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar o efeito corrosivo de diferentes agentes de limpeza sobre as estruturas metálicas. Para isso, foram confeccionados corpos de prova de três diferentes metais utilizados na confecção de próteses: níquel-cromo, alumínio e aço inoxidável. Os mesmos foram imersos nas seguintes soluções: Polident, Efferdent, Mersene, Clorox, Calgon-Clorox, Vinagre e água destilada, pelo tempo total de 240 h. De acordo com os resultados, 240 h de imersão em Polident, Efferdent e água destilada não causaram descoloração e efeitos corrosivos aos metais. No entanto, mudanças foram observadas no níquel-cromo após 8 h de imersão em Clorox e no alumínio após imersão de 8 h em Mersene e Clorox. As mudanças nos metais foram se intensificando no decorrer das 240 h de imersão, resultando em severos manchamentos nas amostras expostas ao Clorox e efeito corrosivo as amostras imersas em Mersene. Após 64 h de imersão em Calgon-Clorox, as amostras apresentaram características semelhantes das encontradas nas amostras expostas ao Mersene. Os autores concluíram que as soluções que apresentaram hipoclorito de sódio em sua composição (Clorox, Mersene e Calgon-Clorox) não podem ser utilizadas para higienização de próteses que possuem metal, pois esta solução pode causar danos às estruturas metálicas.

Bay et al.<sup>10</sup>, em 1978, realizaram um estudo avaliando o efeito da escovação com diferentes concentrações de clorexidina na prevenção do desenvolvimento de biofilme e inflamação gengival. Também foi avaliada a intensidade de mancha nos dentes com relação a diferentes concentrações de solução de digluconato de clorexidina. Quinze estudantes do sexo masculino com idade entre 20 e 24 anos participaram do estudo. O estudo teve duração de 180 dias, sendo realizado em três períodos experimentais, com 60 dias para cada período. No primeiro dia do experimento, os participantes receberam instruções de higiene oral, sendo que a mesma deveria ser seguida nos primeiros 14 dias do estudo, 3 vezes ao dia. No período inicial, os estudantes receberam um creme dental não terapêutico. Passado este período, os estudantes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: G1) escovação com digluconato de clorexidina a 0,15%; G2) escovação com digluconato de clorexidina a 0,10%; G3) escovação com digluconato de clorexidina a 0,05%; e G4) escovação com uma solução placebo (grupo controle). Os alunos realizaram a escovação duas vezes ao dia, sendo que em cada escovação os mesmos imergiam a escova de dente na solução 8 vezes. A intensidade da cor dos dentes, o índice de placa e inflamação gengival foram avaliados clinicamente e através de fotografias tiradas no início, após 14, 30, 45 e no final de cada período de 60 dias. Houve uma redução considerável no índice de placa em todos os grupos após 14 dias. Na avaliação após 45 dias, uma nova redução no índice de placa foi observada para os grupos que realizaram a escovação com

clorexidina. Já para o grupo controle, após 45 dias observou-se um aumento no índice de placa bacteriana. Para os grupos que utilizaram clorexidina durante a escovação, o índice de placa bacteriana após 45 dias, foi inferior a média de placa obtida após 14 dias do estudo, enquanto que para o grupo controle, o índice de placa após 45 dias foi superior à média de placa bacteriana após 14 dias. No final do experimento, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram uma redução de 72, 66 e 43% respectivamente em comparação ao grupo controle, e 57, 47 e 10% de redução no índice de placa bacteriana quando comparados ao índice após 14 dias. Em relação ao índice de inflamação gengival, após 45 dias, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram valores inferiores aos valores obtidos após 14 dias. As fotografias clínicas mostraram que a utilização de clorexidina nas concentrações de 0,15; 0,10 e 0,05% causaram mudança de cor nos dentes. A intensidade das manchas foi diretamente relacionada à concentração da solução de clorexidina. Os autores concluíram que o uso da solução de digluconato de clorexidina nas concentrações de 0,15% e 0,10% foi mais efetivo na redução do índice de placa bacteriana quando comparada à solução de digluconato de clorexidina a 0,05% no final do experimento e que a intensidade da coloração dos dentes está diretamente relacionada à concentração da solução de clorexidina.

Em 1981, Abelson<sup>2</sup> revisou a literatura sobre a relação entre biofilme, patologia oral e eficácia dos produtos comercialmente disponíveis para limpeza de próteses. Os relatos da literatura indicam que (1) a prótese em contato com o tecido oral é sem dúvida um fator etiológico importante na patogênese da estomatite protética, hiperplasia papilar inflamatória, e candidíase crônica e (2) existem deficiências nos produtos populares usados pelo público para a limpeza de suas próteses. O protocolo e os resultados de um estudo para testar a eficácia de um novo produto de limpeza para próteses na remoção de placa são descritos. No presente estudo, o aparelho de ultrassom testado, quando utilizado só com água, foi considerado substancialmente mais eficaz do que dois populares peróxidos alcalinos, o Efferdent e o Polident.

Budtz-Jorgensen<sup>19</sup>, em 1979, realizou uma revisão de literatura sobre os materiais e métodos para higienização de próteses. Os métodos de higienização foram classificados como mecânicos (escovação, pastas, pós e ultrassom) e químicos (peróxido alcalino, hipoclorito alcalino, desinfetantes, enzimas e ácidos orgânicos ou inorgânicos diluídos). A limpeza mecânica é um método efetivo na higienização da prótese e manutenção da mucosa saudável. Não foram encontradas evidências relatando que a escovação com dentífrício ou pasta para polimento seja mais efetiva do que a escovação com sabão. Porém, a maioria dos pacientes prefere utilizar pasta. Para evitar desgaste excessivo, deve-se utilizar dentífrício de baixa abrasividade e escova macia. Os agentes químicos de limpeza são alternativas para pacientes geriátricos usuários de prótese ou que apresentem dificuldades motoras. A imersão noturna da prótese em peróxido alcalino é um meio de limpeza efetivo e seguro. A solução de hipoclorito, apesar de efetiva, apresenta capacidade de branqueamento. Desta forma, seu uso deve ser limitado a uma vez por semana. As soluções de gluconato de clorexidina podem produzir manchamento, porém podem ser prescritas como meio coadjuvante no tratamento da estomatite protética. As próteses devem apresentar superfícies lisas e homogêneas para facilitar sua limpeza.

Em 1983, Budtz-Jorgensen et al.<sup>20</sup> verificaram a eficácia da protease (Alcalase®) na prevenção do acúmulo de placa sobre superfícies de próteses totais superiores através de um estudo duplo-cego. Dezesete usuários de prótese total com mucosa oral clinicamente saudável participaram do estudo. A protease foi administrada em comprimidos solventes contendo 15, 30, 60, 100, 300, 500, ou 1000 mg de enzima. Comprimidos com a enzima ou comprimidos de placebo foram dissolvidos em 150 mL de água a 50° C, e as próteses foram imersas uma vez por dia, durante 15 min. A imersão das próteses foi realizada com ou sem a escovação. O estudo durou 14 semanas. No início de cada período, as próteses foram limpas através de escovação, até que não mostrassem nenhuma placa visível após coloração. No final de cada período a placa foi corada e as próteses foram fotografadas. As fotografias foram projetadas e a porcentagem da área apresentando depósitos de placas foi avaliada em intervalos de 10%. A análise estatística mostrou que houve uma redução significativa de escores de placa quanto maior a concentração de enzima. A redução mais marcante na formação de placa foi observada quando a limpeza mecânica foi combinada com a imersão numa solução de 500 mg de enzima. A uma concentração de 300 mg (ou mais) a imersão em enzima foi tão eficiente quanto a limpeza mecânica para prevenir o acúmulo de placa nas próteses.

Os cuidados de higiene com as próteses dentárias é fundamental para manter a mucosa oral saudável, dessa forma, Paranhos et al.<sup>64</sup> (1991) realizaram uma revisão de literatura sobre os métodos de limpeza de dentaduras. Relatos na literatura indicam que a placa microbiana na superfície interna das próteses é, inquestionavelmente, o maior fator etiológico da patogenia da estomatite, hiperplasia inflamatória e candidíase. Os autores recomendam o uso de escova especial, com formato anatômico e cerdas desenvolvidas especialmente para a higiene das próteses totais, embora reconheçam que a escova comum é a mais utilizada. Eles ainda ressaltam que o método de limpeza combinada (escovação e posterior imersão em agentes químicos) resulta em maior potencial de limpeza. É de responsabilidade do paciente manter adequada higiene oral através da rotina diária de cuidados caseiros, e de obrigação do cirurgião-dentista instruir o paciente quanto aos métodos e agentes de limpeza mais adequados para o controle de placa.

Um estudo foi realizado por Chan et al.<sup>25</sup> (1991) para comparar a eficácia de tabletes efervescentes (Efferdent) e da limpeza mecânica com uma pasta especialmente desenvolvida para dentaduras (Dentu-Creme) em remover bactérias de próteses removíveis. O estudo foi conduzido de forma randomizada, crossover, com 18 indivíduos. A cada consulta, os pacientes foram randomizados para um dos quatro regimes de tratamento: 1) sem tratamento, 2) a escovação com pasta de prótese, 3) imersão em Efferdent, 4) escovação seguida por imersão em Efferdent. Amostragem microbiológica de bactérias nas próteses foi feita antes e depois de cada tratamento. Alíquotas de 10 diluições em série foram semeadas em ágar Schaedler (para anaeróbios totais) e em ágar CVE (para fusobactérias). Análise de covariância foi realizada. Os efeitos dos tratamentos foram significativos:  $F(3,41) = 81,60$ ,  $p < 0,001$  para anaeróbios e  $F(3,50) = 104,38$ ,  $p < 0,001$  para fusobactérias. Comparações utilizando testes Tukey HSD post-hoc mostraram que, para os anaeróbios totais, os tratamentos 1 e 2 produziram pontuações mais elevadas do que os tratamentos

3 e 4. Nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos 3 e 4. Os resultados demonstraram desempenho superior de Efferdent sobre Dentu-Creme.

O objetivo do estudo de Odman<sup>62</sup> (1992) foi o de testar a eficácia da limpeza de próteses com um produto contendo enzimas. Durante um período de 3 semanas, 13 pacientes utilizaram Enzydent apenas para imergirem a prótese, durante outro período de 3 semanas, os pacientes foram orientados a primeiro imergir e depois escovar a dentadura. A eficácia do produto de limpeza foi medida por meio de procedimentos microbiológicos. Os resultados mostraram que a combinação de imersão com a escovação tornou as próteses significativamente mais limpas.

A manutenção da saúde bucal para pacientes hospitalizados, particularmente em pacientes imunocomprometidos, é de suma importância para a prevenção de infecções sistêmicas e orais. Por este motivo, Epstein et al.<sup>34</sup>, em 1994, realizaram um estudo comparando a eficácia do uso de uma escova dental e de uma escova de espuma imersa em clorexidina 0,2% no controle de biofilme e na redução no índice de gengivite. Participaram deste estudo 27 indivíduos. Os mesmos receberam no início do tratamento: escova dental, escova de espuma e solução de clorexidina a 0,2%. Os participantes foram instruídos a mergulhar a escova de espuma antes da escovação em um copo contendo 15 mL de solução de clorexidina. A higienização com escova dental e a escova de espuma imersa na solução de clorexidina era realizada duas vezes ao dia, durante duas semanas. Os participantes foram divididos randomicamente entre dois grupos. O grupo número 1 realizou na primeira semana escovação com escova de dente tradicional podendo fazer uso do creme dental habitual e na segunda semana foram instruídos a realizar a escovação com a escova de espuma imersa em clorexidina. O grupo número 2 realizou na primeira semana a escovação com escova de espuma imersa em clorexidina e na segunda semana realizaram a escovação com escova de dente tradicional, podendo fazer uso do creme dental. O índice de placa bacteriana e gengivite foram avaliados em seis diferentes sítios da cavidade bucal. Após o estudo os autores observaram que a escovação com escova de espuma imersa em clorexidina a 0,2% foi tão eficaz quanto a escovação com escova dental tradicional, e concluíram que a escovação com escova de espuma imersa em clorexidina é um método de higienização alternativo para pacientes hospitalizados.

Nikawa et al.<sup>59</sup> (1995) avaliaram, *in vitro*, a eficácia de higienizadores de próteses na redução da atividade de um biofilme de *Candida albicans*. Onze higienizadores de próteses foram testados: Steradent, Doctor Health, Dent Free, Nisodent, Polident, Liodent, Cleansoft, Pika DECE, Plakick, Spa Dent e emuCAE. Estes agentes de limpeza foram distribuídos em cinco grupos: peróxido alcalino, peróxido neutro com enzimas, enzimas, drogas naturais e desinfetante. Para os testes, espécimes foram contaminados com cepas padrão de *C. albicans* e imersos em 200 mL de cada solução higienizadora. Após 24 h e 30 h de incubação, o pH do meio de cultura com cada espécime foi medido para avaliar a atividade residual do biofilme. Os resultados mostraram que, com 2 h de incubação, células vivas de *C. albicans* não foram detectadas em qualquer um dos higienizadores a base de peróxido, e que o peróxido alcalino (Steradent), o peróxido neutro com enzimas (Doctor Health, Dent Free, Nisodent, Polident e Liodent), o desinfetante (emuCAE) e o higienizador enzimático (Clean Soft) reduziram a atividade do biofilme.

A etiologia da estomatite protética não está clara na literatura. Alguns estudos mostram que a *Candida albicans* é o causador integral da doença, enquanto outros apontam para a importância de outros micro-organismos. Por este motivo, Kulak et al.<sup>42</sup> (1997) investigaram a existência de *C. albicans* e outros micro-organismos em pacientes com e sem estomatite protética. Os resultados mostraram que é mais provável que a combinação de *C. albicans* com outros micro-organismos seja responsável pela estomatite protética.

A rugosidade superficial das próteses apresenta uma importância significativa no processo de retenção bacteriana. Dessa forma, Bollen et al.<sup>15</sup>, em 1997, realizaram uma revisão de literatura para verificar a rugosidade inicial e suas alterações após diversos tipos de tratamentos. Estudos in vivo sugerem um valor de rugosidade superficial de  $Ra = 0,2 \mu m$ , abaixo do qual nenhuma redução no acúmulo de bactéria poderia ser esperada. Valores maiores de rugosidade promoveriam um maior acúmulo de placa e, conseqüentemente, aumento do risco de cárie e de inflamação periodontal. Quanto à rugosidade da resina acrílica, os estudos não citam um procedimento de acabamento ou polimento que reduza claramente essa propriedade. Compressão da resina acrílica contra uma placa de vidro, assim como para as resinas compostas, promove um valor de rugosidade bem abaixo do limiar aceitável. A rugosidade superficial da parte interna das bases de próteses auxilia na determinação da colonização dessas superfícies por diferentes micro-organismos. Esta colonização será maior quanto mais rugosa for a superfície. Escovação agressiva e repetida das próteses com agentes de limpeza abrasivos irá tornar rugosas mesmo as superfícies que, inicialmente, apresentavam-se lisas. Com base nestas informações, os autores verificaram que todos os materiais odontológicos necessitam de um tratamento específico para a obtenção e manutenção de superfícies lisas o suficiente a evitar um maior acúmulo de micro-organismos.

MacNeill et al.<sup>52</sup> (1997) compararam os efeitos in vitro da clorexidina a 0,12% sobre a *C. albicans* ao longo do tempo. Neste estudo, cepas de *C. albicans* ATCC foram incubadas em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) por 48 h. Em seguida, as placas foram divididas em: Grupo 1- sem tratamento (grupo controle); e Grupo 2- amostras encobertas por 1 mm de clorexidina 0,12%. Todas as culturas foram incubadas por 10 dias e leituras para se verificar a viabilidade celular foram realizadas nos dias 2, 4, 6, 8 e 10. As leituras foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Na observação visual, o grupo controle apresentou viabilidade celular de 100% em todos os dias, enquanto que o grupo tratado com clorexidina apresentou redução de 30% na viabilidade celular no terceiro dia, 60% no quarto e 100% a partir do quinto dia. Na observação pela microscopia eletrônica de varredura, as colônias do grupo controle, em todos os dias, se apresentaram com tonalidades brancas, com aparência macia, úmida ou brilhante e formato ovoide levemente elevado. No grupo tratado com clorexidina, após o quarto dia, as colônias apresentaram-se em forma irregular e achatadas. No exame de microscopia eletrônica de transmissão, o grupo controle apresentou organização celular uniforme e o tratado com clorexidina, a partir do quarto dia, apresentou desorganização da membrana e organelas celulares, resultado de lise ou descamação. Os autores concluíram que o tratamento da



doença periodontal pode ser realizado com irrigação ou enxaguatórios de clorexidina para evitar o crescimento de *C. albicans* e outros fungos.

Também em 1997, Kulak et al.<sup>43</sup> avaliaram o efeito da escovação e imersão em soluções desinfetantes na contaminação das superfícies da prótese por micro-organismos. Oito amostras de próteses totais superiores de cinco pacientes foram utilizadas para o ensaio. Uma das oito amostras foi deixada sem tratamento (controle), e as demais foram submetidas à imersão em período noturno em uma das seguintes soluções desinfetantes: Corega, Dentipur, Fittydent, Hipoclorito de sódio 5%, Savlon, Setrimid com clorexidina, Ipanol e escovação com creme dental e escova macia. A superfície da resina foi avaliada em microscópio eletrônico antes e após os tratamentos. Houve diferença significativa entre os tratamentos. Comparado com o controle, todos os tratamentos reduziram a área recoberta por materiais estranhos, sendo os melhores resultados encontrados para Savlon e hipoclorito de sódio.

Estudos têm demonstrado que a *Candida* e outros micro-organismos orais, incluindo *Streptococcus gordonii*, estão associados com o biofilme em dentaduras, por este motivo, a higiene da dentadura é um fator importante na prevenção e tratamento de doenças. O objetivo do trabalho de Webb et al.<sup>92</sup> (1998) foi testar a eficácia in vitro de dois métodos de esterilização de próteses: (1) irradiação por micro-ondas e (2) imersão em hipoclorito de sódio. Vinte próteses acrílicas superiores foram preparadas para o ensaio microbiológico; 10 foram inoculadas com *C. albicans* H1 e 10 com *S. gordonii* LGR2. Dentro de cada grupo, cinco próteses foram testadas em um forno de micro-ondas doméstico. As próteses do grupo controle não foram para o micro-ondas. As análises microbiológicas mostraram que as próteses inoculadas se tornaram estéreis após seis minutos de irradiação (2450 MHz, 350 W). Eram claramente visíveis danos aos micro-organismos através microscopia eletrônica de varredura (MEV) após a irradiação em micro-ondas. Seguindo o mesmo protocolo, próteses experimentais foram imersas durante 8 h ou em solução de hipoclorito a 0,02%, ou 0,0125% , e as próteses do grupo controle foram imersas em água destilada. As análises microbiológicas mostraram que as próteses experimentais inoculadas com *C. albicans* H1 se tornaram estéreis. Por outro lado, aquelas inoculadas com *S. gordonii* LGR2 não se tornaram estéreis, e os procedimentos de MEV confirmaram esses achados. Os resultados deste estudo indicam que o uso de micro-ondas pode ser um método mais eficaz de esterilização de próteses do que a imersão em hipoclorito de sódio. No entanto, em comparação com micro-ondas, o hipoclorito reduz os níveis de resíduos não viáveis de micro-organismos que aderem à superfície da prótese.

MacNeill et al.<sup>53</sup>, em 1998, investigaram a ação da escovação sobre a remoção de micro-organismos presentes em discos de Petri e verificaram os danos causados por este método sobre os mesmos. Foram obtidos três grupos: grupo controle – sem escovação; grupo com escovação mecânica e grupo com escovação com escova de dente elétrica. Um meio de cultura com o micro-organismo *A. viscosus* foi cultivado overnight. Cada grupo de tratamento consistia de 10 corpos de prova contendo 5 mL da alíquota de *A. viscosus* cultivada. O ensaio da escovação foi realizado por quatro intervalos sucessivos de 15 s, totalizando 60 s de escovação. Após a escovação, os corpos de prova foram agitados e uma alíquota de 10 µL da solução foi diluída, plaqueada em um meio de

cultura e incubada por 48 h a 37 °C. Em seguida, os valores de ufc/mL foram calculados. Uma análise microscópica foi realizada para observar os danos causados aos micro-organismos após os corpos-de-prova serem submetidos ao método da escovação. A escova de dente elétrica demonstrou ser menos efetiva na redução dos valores de ufc/mL, nos intervalos de 15, 30 e 45 s de escovação, quando comparada aos outros dois grupos. No tempo de escovação de 45 s, a escovação mecânica apresentou maior valor de ufc/mL quando comparada ao grupo controle. Os micro-organismos presentes nos corpos de prova submetidos à escovação mecânica apresentaram morfologia semelhante aos micro-organismos do grupo controle para intervalos de tempo menores que 30 s. Para intervalos de tempo maiores ou iguais a 30 s, o biofilme apresentou danos na sua superfície. Em relação ao biofilme escovado com escova de dente elétrica, além de apresentar danos na superfície do biofilme, os autores observaram uma menor agregação dos micro-organismos. Para todos os grupos, não foi observado erradicação dos micro-organismos. Os autores concluíram que, apesar dos métodos de escovação resultarem em danos à superfície do biofilme, não afetaram a viabilidade celular.

No mesmo ano, Pratten et al.<sup>74</sup>, em um trabalho in vitro, avaliaram a eficácia da clorexidina sobre a vitalidade de bactérias agrupadas em biofilmes. Após a confecção de biofilmes compostos por bactérias coletadas nos dentes, os autores expuseram estes biofilmes à soluções de 0,2% de clorexidina por 1, 5 e 60 minutos. Os resultados mostraram que os biofilmes expostos a 1 e 5 minutos ao antimicrobiano não apresentaram efeito significativo na vitalidade bacteriana. No entanto, houve uma redução estatisticamente significativa na contagem de células bacterianas vitais após 60 minutos de exposição ao produto.

Taylor et al.<sup>87</sup>, ainda em 1998, investigaram o efeito do acabamento de superfície dos materiais dentários na subsequente contaminação por micro-organismos. Este estudo comparou a retenção de *Streptococcus oralis*, *Actinomyces viscosus*, e *Candida albicans* em resina acrílica e em ligas de cobalto-cromo polidas, jateadas (com areia fina e grossa) e com banho de eletrobrilho. As suspensões de células foram padronizadas e incubadas com os materiais de teste durante 1 hora a 37°C, em seguida, as células foram contadas por meio de análise de imagem. A retenção de células bacterianas foi substancial (*S. oralis* 12% a 20% e *A. viscosus* 9% a 16%), independentemente do acabamento de superfície. Retenção máxima foi observada nas ligas de cobalto-cromo que haviam sido submetidas a jato de areia fina e eletrobrilho. Para a *C. albicans*, um aumento na rugosidade da superfície resultou em aumento de retenção (3% a 9%). Concluiu-se que o tamanho das células e o tipo de rugosidade afetaram significativamente a retenção de micro-organismos nas superfícies.

No ano de 1999, Nikawa et al.<sup>60</sup> realizaram uma revisão de literatura sobre os métodos empregados para limpeza de próteses. Os autores observaram que o método mais comumente utilizado para o controle diário de biofilme foi a higienização mecânica com escova (com ou sem sabão, pasta ou abrasivo). No entanto, vários estudos relataram que a escovação pode causar maior desgaste da resina acrílica da prótese e que este método é insuficiente para reduzir o número de micro-organismos das próteses. De acordo com os artigos, a utilização de soluções químicas é indispensável no cuidado diário das próteses. Dentre as soluções químicas utilizadas para este fim

encontram-se os hipocloritos, peróxidos, peróxidos neutros com enzimas, ácidos e enxaguatórios para próteses. Os autores consideraram ainda nessa revisão as características dos estudos experimentais utilizando placa in vivo e in vitro. Os estudos in vivo apresentam algumas desvantagens, como a incerteza da quantidade de biofilme inicial, que difere entre cada paciente. Além disso, existem dificuldades como a seleção do micro-organismo a ser estudado, e como e onde a amostra microbiológica será coletada. Já os estudos in vitro são vantajosos, pois utilizam ensaios mais simples que os estudos in vivo, permitindo avaliar a eficácia das soluções de limpeza, ainda que a aplicação clínica dos estudos in vitro seja questionável.

Ainda em 1999, Sesma et al.<sup>81</sup> realizaram um estudo para avaliar a eficácia de 3 métodos caseiros para a higienização de próteses (escovação com dentífrico, associação de escovação e imersão em peróxido alcalino e associação de escovação e aplicação de clorexidina 2%), através de uma análise em microscópio eletrônico de varredura. Observou-se que o uso de escova de dente e dentífrico não foi eficiente na remoção do biofilme da superfície da prótese. A associação desse método mecânico com a imersão da prótese em um produto químico efervescente à base de peróxido alcalino melhorou a higienização, em comparação ao método anterior. A aplicação de clorexidina 2% na parte interna da sela da prótese associada ao método mecânico foi mais eficiente do que os outros métodos.

Estrela et al.<sup>35</sup> (2002) realizaram uma ampla revisão de literatura com o objetivo de discutir o mecanismo de ação do hipoclorito de sódio a partir das suas propriedades físico-químicas e antimicrobianas. De acordo com os autores, o hipoclorito de sódio é capaz de promover alterações no metabolismo celular, com destruição de fosfolipídios pela formação de cloraminas, que interferem no metabolismo celular pela ação oxidante, com inibição enzimática irreversível nas bactérias, e pela degradação de ácidos graxos e lipídeos. Além disso, esta solução é uma base forte (pH>11) e seu pH elevado pode alterar a integridade da membrana citoplasmática através de injúrias aos componentes orgânicos e ao transporte de nutrientes, ou por meio da degradação de fosfolipídios ou ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática. Esta reação causa alteração da biossíntese celular e danos irreversíveis à mesma, resultando em morte celular. Por fim, os autores relataram que o hipoclorito de sódio é recomendado pela maioria dos cirurgiões dentistas por ser, além de potente antimicrobiano, uma solução biocompatível em baixas concentrações.

Muitos pacientes idosos hospitalizados não podem escovar adequadamente suas próteses por causa de demência, doenças e/ou falta de destreza. A limpeza inadequada pode permitir a multiplicação de *Candida* spp. e bactérias, que podem servir como reservatórios para infecções. Desta forma, o objetivo do estudo de Gornitsky et al.<sup>38</sup>, em 2002, foi avaliar a eficácia de três limpadores de dentaduras na redução do número de micro-organismos em próteses numa população geriátrica hospitalizada. Três diferentes marcas (Denture Brite, Polident e Efferdent) foram comparadas e a água foi usada como controle. Amostras microbiológicas foram obtidas antes e depois de uma semana e três períodos de uso. O ranking das diferenças no número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida* spp. antes e depois de uma semana de utilização do produto Denture Brite (p = 0,04) e Polident (p = 0,01), foram significativamente maiores do que a do

grupo de controle, mas não houve diferença entre a utilização de Efferdent e do controle ( $p = 0,10$ ). Não houve diferenças significativas na redução de *Streptococcus mutans* após a utilização do Denture Brite ( $p = 0,13$ ) ou Polident ( $p=0,12$ ) e no grupo controle, enquanto que as dentaduras limpas com Efferdent apresentaram redução significativamente maior de *Streptococcus mutans* ( $p = 0,02$ ) do que dentaduras limpas com água. Em todos os períodos de estudo, não houve diferenças significativas entre os limpadores na redução de *Candida* spp. ou *Streptococcus mutans*. Próteses limpas com Denture Brite, Polident ou Efferdent pareciam ter reduções semelhantes no nível de biofilme, mancha e alimentos, e todas tiveram reduções substancialmente maiores do que as dentaduras limpas apenas com água. A utilização de produtos de limpeza para dentaduras reduziu significativamente o número de micro-organismos nas próteses de uma população geriátrica hospitalizada.

Em 2003, Pavarina et al.<sup>68</sup> avaliaram um protocolo de controle de infecção para a limpeza e desinfecção de próteses dentárias removíveis. Quatro substâncias foram testadas: gluconato de clorexidina 4%, hipoclorito de sódio a 1%, Biocide (iodóforos) e Amosan (peróxido alcalino). Para este estudo foram selecionados 32 pacientes que possuíam próteses totais ou parciais removíveis. As próteses deveriam estar em uso por pelo menos seis meses. Na primeira fase do estudo, as culturas foram obtidas a partir das próteses, diretamente da boca do paciente. Todas as superfícies das próteses foram vigorosamente esfregadas com cotonete estéril. As amostras foram colocadas individualmente em meio de cultura tioglicolato. Após um período de incubação de 24 horas, o meio de cultura foi observado para determinar a presença de crescimento microbiano. Neste estudo, nenhum método de quantificação foi usado. As culturas foram interpretadas como crescimento positivo ou negativo. O crescimento positivo foi indicado pela presença de turvação, formação de película e/ou formação de sedimentos nos recipientes. Para eliminar o material orgânico que permaneceu sobre a prótese, cada prótese foi limpa durante 1 minuto com clorexidina 4% e escova macia, e enxaguada em água estéril durante 1 minuto. As próteses foram então divididas em quatro grupos de oito dentaduras cada e colocadas durante 10 minutos em sacos estéreis contendo 200 mL de uma das seguintes soluções desinfetantes: gluconato de clorexidina 4%; hipoclorito de sódio 1%; solução de biocide 0,48% e solução de Amosan 3,78%. Após os procedimentos de desinfecção, as próteses foram esfregadas novamente com swab estéril e os esfregaços foram então imersos no meio de cultura e incubados por 24 h. Os resultados da cultura inicial revelaram que o crescimento foi positivo para todas as próteses. Dentro dos limites do presente estudo, concluiu-se que a limpeza com escova macia e clorexidina 4%, combinados com a imersão em três das soluções avaliadas (Amosan, gluconato de clorexidina 4% e hipoclorito de sódio a 1%) foi eficaz na redução do crescimento microbiano após 10 minutos. Segundo os autores, o protocolo avaliado neste estudo mostra-se promissor como um sistema de controle de infecção a ser utilizado na prevenção da contaminação cruzada.

Harrison et al.<sup>39</sup>, em 2004, avaliaram a abrasividade de quatro produtos de limpeza para dentaduras na superfície de discos de resina acrílica (20 mm x 2 mm) e sua capacidade de remover *Candida albicans*. Quatro produtos de limpeza foram avaliados: creme dental convencional (Colgate

Total); creme dental com removedor de manchas (Clinomyn); pasta para limpeza de dentaduras (Dentu-Crème), um produto de limpeza de imersão a base de peróxido de sódio (Steradent extra strenght) e água (controle). Estes foram utilizados nas diluições de 1:1, 1:2 e 1:3 com água. Uma escova de dente elétrica foi usada e simulou-se um ano de limpeza. A rugosidade da superfície dos discos foi medida antes e depois da limpeza, e em seguida os mesmos foram inoculados com *C. albicans*. A eficácia dos produtos de limpeza em remover as células de *C. albicans* foi avaliada após um evento único de limpeza. O limpador de imersão foi significativamente menor do que produtos de limpeza abrasivos em pasta ( $P < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas entre quaisquer diluições para qualquer produto de limpeza usado ( $P > 0,05$ ). Os limpadores de imersão e as pastas abrasivas removeram quase todo o biofilme de *C. albicans* sobre os discos, e a limpeza apenas com água foi a menos eficaz ( $P < 0,05$ ).

Em 2004, Marchini et al.<sup>51</sup> realizaram um estudo da relação entre higienização das próteses e condições dos tecidos bucais de pacientes da Universidade de Mogi das Cruzes. Foram selecionados 236 voluntários usuários de próteses totais. Os voluntários responderam a um questionário e foram submetidos a um exame clínico. Constatou-se que, de todos os avaliados, 43,6% procuraram atendimento odontológico após 10 anos da última consulta e 22,9% procuraram atendimento odontológico após 6 a 10 anos da última visita ao dentista. Com relação à higienização das próteses, 77,5% dos pacientes afirmaram não ter recebido nenhuma instrução de higiene, em semelhança aos resultados obtidos para a higienização da cavidade bucal, nos quais apenas 22,9% dos pacientes receberam orientações. Em 42,4% dos voluntários foi observada a presença de estomatite protética. Porém, a maioria deles (89%) não apresentava nenhum tipo de sintomatologia. O método mais utilizado para a higienização das próteses foi o método mecânico da escovação (98,7%). O método de imersão também foi relatado, porém, com menor frequência (27,1%). As soluções mais comuns para a imersão das próteses foram água/hipoclorito de sódio e água/bicarbonato de sódio. Os autores relataram ainda que houve uma relação significativa entre presença de estomatite protética e falta de higienização da prótese e mucosa oral.

A estomatite protética associada à *Candida* está relacionada à falta de higiene das próteses. Por este motivo, Webb et al.<sup>93</sup>, em 2005, testaram a eficácia de dois métodos de tratamento para a estomatite protética em asilos. Sessenta pacientes com estomatite protética foram divididos aleatoriamente em três grupos: imersão da prótese em hipoclorito de sódio, irradiação em micro-ondas e controle. Ambos os métodos de tratamento foram realizados todas as noites, durante uma semana, com exceção do grupo controle. Fotografias padronizadas e amostras microbianas do palato e próteses superiores e inferiores foram obtidas antes e após os tratamentos. Os resultados mostraram que tanto o hipoclorito de sódio quanto a irradiação por micro-ondas reduziram significativamente o número de *Candida* e bactérias aeróbias em ambas as próteses, e que ambos os métodos reduziram significativamente a quantidade de *Candida* no palato. No entanto, as bactérias aeróbicas palatais não foram significativamente reduzidas por qualquer um dos métodos e os controles apresentaram reduções insignificantes de *Candida* e aeróbios no palato e nas próteses.

Em 2005, Sesma et al.<sup>82</sup> avaliaram, in vivo, por meio de análises microbiológicas e imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a limpeza de próteses totais imersas em um produto enzimático. O produto efervescente enzimático utilizado foi um peróxido alcalino (Ortoform®, Farmácia de Manipulação Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil), na forma de um pó solúvel em água, embalado em sachês de 5,4g composto por perborato de sódio e uma enzima. A pesquisa teve duas fases com duração de uma semana cada. Na 1ª fase, 10 pacientes utilizaram escova e pasta para higienizar suas próteses. Na 2ª fase, associaram escovação com imersão da prótese em produto químico enzimático durante a noite. A análise microbiológica revelou que a eficiência do tratamento químico em eliminar os micro-organismos foi de 53% e as observações em MEV confirmaram este resultado. Concluiu-se que a associação dos dois métodos reduziu quase à metade a quantidade de micro-organismos presentes nas próteses e removeu parcialmente o biofilme que cobria a parte interna das bases protéticas.

Também em 2006, Chassot et al.<sup>27</sup> avaliaram a eficácia antimicrobiana in vivo e in vitro de um desinfetante a base de ácido peracético para a descontaminação de resinas acrílicas termicamente ativadas, quimicamente ativadas e ativadas em micro-ondas. Placas intra-orais foram fabricadas a partir das resinas acrílicas Clássico (termicamente ativada), Jet (quimicamente ativada) e Ondacryl (ativada por micro-ondas). As placas de resina acrílica intra-orais foram usadas por 10 estudantes de odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todos os voluntários utilizaram uma placa intra-oral de cada tipo de resina. Os voluntários receberam as placas de resina acrílica e foram instruídos a usá-las por sete noites consecutivas. Depois de cada período noturno de utilização, as placas eram lavadas em água corrente e armazenadas individualmente em recipientes de plástico fechados durante o dia. Foi altamente recomendado que as placas não fossem escovadas, limpas ou desinfetadas com pasta de dente ou qualquer solução desinfetante. Após o período de utilização, as placas foram seccionadas e seis fragmentos quadrados de resina acrílica foram obtidos a partir de cada placa. Para cada tipo de resina, 40 fragmentos foram imersos em um desinfetante à base de ácido peracético 0,2% (Sterilife®), metade dos espécimes por 5 minutos e a outra metade das amostras por 10 min, lavadas em água destilada e colocadas individualmente em tubos de ensaio contendo 5 mL de Brain Heart Infusion (BHI). O crescimento bacteriano foi observado através da análise da turvação do meio de cultura, após a incubação. Neste estudo, a eficácia antimicrobiana do desinfetante a base de ácido peracético foi também avaliada contra os micro-organismos *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus*. Parte das amostras contaminadas de cada tipo de resina foi imersa no desinfetante à base de ácido peracético (Sterilife®), metade durante 5 minutos e metade durante 10 minutos. O crescimento bacteriano foi observado através da análise da turvação do meio de cultura, após o período de incubação. No experimento in vivo, para todos os tipos de resina acrílica (termicamente ativada, quimicamente ativada e ativada em micro-ondas), nenhuma turvação do meio de cultura BHI foi observada para qualquer uma das amostras de resina imersas no desinfetante à base de ácido peracético por 5 ou 10 minutos, o que indica a ausência de crescimento bacteriano nas condições de aerobiose ou anaerobiose. Por outro lado, os meios que continham os espécimes que não foram imersos no

desinfetante (controle) mostraram turbidez em 100% dos casos, indicando a presença de microorganismos nas condições de aerobiose ou de anaerobiose. No experimento in vitro, para todos os tipos de resina acrílica, nenhuma turvação do meio de cultura BHI foi observada para qualquer uma das amostras de resina contaminadas *Bacillus subtilis* ou *Bacillus stearothermophilus* após a imersão no desinfetante a base de ácido peracético durante 5 ou 10 minutos. Por outro lado, meios de cultura BHI contendo as amostras contaminadas que não foram imersas no desinfetante (controle) mostraram turbidez em 100% dos casos, o que indica a contaminação microbiana. Concluiu-se que a imersão por pelo menos 5 minutos em um desinfetante à base de ácido peracético 0,2% promoveu alto nível de desinfecção nas resinas acrílicas estudadas contaminadas com saliva humana, *Bacillus subtilis* ou *Bacillus stearothermophilus*.

Li et al.<sup>47</sup> (2007) realizaram um estudo acerca do papel da *Candida glabrata* na patogênese da estomatite protética. Devido ao uso generalizado de terapia imunossupressora e de antimicóticos de amplo espectro, a *C. glabrata* emergiu como um importante patógeno oportunista na mucosa oral. No passado, estudos sobre os fatores de virulência e interações patógeno-hospedeiro deste microorganismo eram escassos, mas aumentaram nos últimos anos. Usuários de dentaduras, imunossupressão, antibioticoterapia e envelhecimento são fatores de risco para a colonização oral ou infecção por *C. glabrata*. Em comparação com a *C. albicans*, a *C. glabrata* apresenta menor capacidade de adesão a queratinócitos orais, mas maior capacidade de aderência às superfícies das próteses. A *C. glabrata* é menos suscetível às beta-defensinas humanas do que a *C. albicans*, e exibe vários graus de resistência à atividade antifúngica de histatinas salivares e mucinas. Além disso, a *C. glabrata* possui resistência inata e adquirida contra drogas antifúngicas devido à sua capacidade para modificar a biossíntese de ergosterol, a função mitocondrial, ou o efluxo de antifúngicos. Esta resistência permite seu maior crescimento em comparação com outras espécies sensíveis, e pode contribuir para o aparecimento de infecções por *C. glabrata* em populações cronicamente imunocomprometidas. Novas investigações sobre a virulência e a interação patógeno-hospedeiro da *C. glabrata* são necessárias para definir melhor a patogênese de sua infecção por via oral em hospedeiros suscetíveis.

O objetivo do estudo de Al-Bakri, Afifi<sup>3</sup> (2007) foi examinar e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas indígenas dissolvidas em dimetilsulfóxido, utilizando o ensaio de XTT rápido e métodos de contagem de colônias viáveis. O ensaio de XTT rápido foi usado para analisar a atividade antimicrobiana inicial dos extratos de plantas. Este estudo mostrou que, embora os métodos de XTT e contagem de colônias viáveis sejam comparáveis ao estimar a atividade antimicrobiana global das substâncias experimentais, não existe uma correlação linear forte entre eles.

Paraskevas et al.<sup>67</sup>, em 2007, avaliaram o efeito de um dentifício sobre a eficácia da escovação. Trinta e seis pacientes com a presença de cinco dentes naturais por quadrante participaram do estudo. Os participantes foram divididos em dois grupos: Grupo 1- escovação dos dentes com dentifício (NaF) durante 2 min (30 s por quadrante, divididos em 15 s por vestibular e 15 s por lingual) e Grupo 2- escovação dos dentes sem dentifício, imergindo a escova apenas em água. Antes do início do estudo, os participantes foram instruídos a não realizar nenhum método de higiene

oral 48 h antes da primeira avaliação. Passado este período, os participantes passaram pela primeira avaliação, onde foi realizada a coloração do biofilme e os índices de placa foram obtidos. Os participantes, então, ganharam uma escova de dente e foram instruídos a realizar a escovação com e sem dentífrico. No final do procedimento, o biofilme remanescente foi novamente corado e os índices de placa anotados. Decorrida 1 semana, os pacientes retornaram ao consultório e o mesmo procedimento de não realizar nenhum método de higiene oral 48 h antes da consulta foi adotado. Nesta consulta, nova avaliação do biofilme foi realizada antes da escovação e os procedimentos foram repetidos nos dois grupos e, após a escovação, nova avaliação do índice de placa foi realizada. Os resultados mostraram que a escovação com dentífrico resultou em uma média de redução do biofilme de 50%, enquanto que a escovação com água reduziu o biofilme em torno de 56%. De acordo com os autores, a razão para a menor redução de biofilme no grupo de escovação com dentífrico pode estar relacionado aos componentes deste dentífrico, como abrasivos ou detergentes. Estes componentes contribuem para uma diminuição da efetividade do dentífrico na remoção do biofilme. Sendo assim, concluiu-se que o uso de dentífrico não contribuiu para a remoção de biofilme durante a escovação mecânica. Ainda, a ação mecânica fornecida pela escova dental foi o principal fator no processo de remoção do biofilme.

Vários autores apontam o método da escovação com dentífrico como o mais utilizado para higienização pelos portadores de prótese removível. Por este motivo, Paranhos et al.<sup>65</sup> em 2007, estudaram o efeito dos métodos mecânico e químico sobre a quantificação de biofilme de superfície interna de próteses. Pacientes portadores de próteses há mais de um ano, com acúmulo de biofilme na superfície interna da prótese, foram selecionados para o estudo. Os voluntários foram instruídos a realizar a limpeza da prótese de acordo com os seguintes métodos: 1- (grupo controle): lavagem da prótese com água após as refeições e sua imersão durante a noite em água; 2- Químico: lavagem da prótese com água após o café e almoço e sua imersão em solução de peróxido alcalino (Bonyplus) por 5 min após o jantar; 3- Mecânico I: escovação da prótese três vezes ao dia com escova dental macia (Johnson & Johnson) e dentífrico (Dentu Creme) durante 2 min; 4- Combinação I: combinação entre o método 2 e 3; 5- Mecânico II: similar ao método 3, porém com uma escova de dente da marca Oral B com cerda macia; 6- Combinação II: combinação entre os métodos 2 e 5. Todos os voluntários realizaram os 6 métodos descritos, durante 7 dias cada método, em uma sequência aleatória. As próteses foram fotografadas antes e após cada método para avaliar a porcentagem de redução de biofilme. Todos os métodos testados apresentaram diminuição na quantidade de biofilme após o término do estudo. O grupo controle (lavagem com água) foi o que apresentou menor redução de biofilme quando comparado aos demais métodos. Os métodos 3 e 5, e os métodos 4 e 6, foram igualmente eficazes e superiores ao método 2. Os autores concluíram que o método mecânico (escovação) ou a combinação deste com um método químico de higienização foram os mais eficazes para a higienização das próteses.

Apesar do progresso terapêutico, a prevalência de doenças infecciosas causadas por fungos oportunistas orais aumentou, especialmente em usuários de prótese total. A combinação entre aprisionamento de leveduras em irregularidades da base da prótese e materiais reembasadores, má



higiene bucal e diversos fatores sistêmicos é a causa mais provável para o aparecimento desta doença infecciosa. Então, a colonização e o crescimento de espécies de *Candida* em próteses são de importância clínica. O objetivo da revisão de Pereira-Cenci et al.<sup>71</sup>, em 2008, foi discutir criticamente vários fatores-chave que controlam a adesão de espécies de *Candida* e que são relevantes para o surgimento da estomatite protética. Embora não haja um consenso sobre o papel das propriedades de superfície, estudos sobre vários outros fatores, como o uso de reembasadores, propriedades salivares e interações entre leveduras e bactérias têm mostrado resultados contraditórios. Uma compreensão abrangente fundamental é dificultada por descobertas conflitantes devido às grandes variações de protocolos experimentais, enquanto outros fatores nunca foram minuciosamente estudados. A energia livre e rugosidade da superfície influenciam na aderência inicial, mas as mudanças ao longo do tempo não foram relatadas. A contribuição da saliva é incerta devido a fatores como variações na sua coleta e tratamento. Os resultados iniciais deste estudo revelaram que as bactérias também são cruciais para o sucesso do crescimento de *Candida* em biofilmes. Em conclusão, há uma necessidade de uniformizar procedimentos experimentais para preencher a lacuna entre metodologias in vitro e in vivo e, em geral, para investigar minuciosamente os fatores que modulam a aderência inicial e a subsequente colonização dos materiais para base de próteses e da mucosa bucal de pacientes submetidos a infecções por *Candida*. As informações sobre como estes fatores podem ser controlados são necessárias, e isto pode ajudar a prevenir a doença.

No mesmo ano, o efeito de diferentes soluções desinfetantes sobre a capacidade de remoção de micro-organismos foi verificada por da Silva et al.<sup>83</sup> Para o estudo utilizou-se soluções desinfetantes de hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2%, glutaraldeído 2%, vinagre 100%, tabletes comerciais de perborato de sódio, e perborato de sódio 3,8%. Corpos de prova de uma resina quimicamente ativada foram contaminados in vitro por *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* e submetidos à imersão em uma das soluções desinfetantes em estudo. Após a imersão, foram medidas as unidades formadoras de colônia residuais. Um experimento foi feito separadamente para avaliar o efeito das soluções sobre a rugosidade superficial da resina acrílica, o que poderia facilitar a aderência. As soluções de hipoclorito de sódio, glutaraldeído e clorexidina foram as mais efetivas contra os micro-organismos analisados, seguidos por vinagre, perborato de sódio e tabletes comerciais. A rugosidade superficial foi maior após a desinfecção com perborato de sódio e menor para a clorexidina. Concluiu-se que o hipoclorito de sódio, o glutaraldeído, a clorexidina, o vinagre e o perborato de sódio são alternativas válidas para a desinfecção da resina acrílica.

Embora a *Candida albicans* seja o patógeno oral predominante na estomatite protética, outras espécies também podem desempenhar um papel fundamental na patogênese. Por este motivo, Coco et al.<sup>28</sup>, em 2008, realizaram um estudo com o objetivo de examinar a ecologia micológica em pacientes com estomatite protética, usando uma técnica de amostragem melhorada, para determinar a diversidade e a quantidade de espécies que estão relacionadas com a patologia oral. Trinta e sete pacientes foram incluídos no estudo. A história clínica completa de cada paciente foi obtida, incluindo detalhes de suas práticas de higiene oral e os níveis de eritema com base na escala de classificação

de Newton. Foram obtidas amostras de enxague bucal, sonicação das próteses e esfregaços das mesmas, que foram processados para análise quantitativa e qualitativa de leveduras orais. A proporção de pacientes enquadrados na classificação de Newton nos tipos 0 (saudável), I (eritema localizado), II (eritema difuso) e III (eritema severo), foi de 31, 33, 25 e 14%, respectivamente. As leveduras orais isoladas predominantes foram *C. albicans* (75%) e *Candida glabrata* (30%), que foram encontradas em proporções mais elevadas em pacientes com graus mais severos de inflamação, e apresentaram-se combinadas em 80% destes pacientes. Este estudo demonstrou que o biofilme misto de *C. albicans* e *C. glabrata* pode desempenhar um papel importante na patogênese associada à grave inflamação em usuários de próteses.

Para investigar as interações entre os biofilmes de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*, Pereira-Cenci et al.<sup>72</sup>, em 2008, cultivaram biofilmes de uma única espécie (*C. albicans* e *C. glabrata*) e biofilmes de dupla espécie (*S. mutans* + *C. albicans*), (*S. mutans* + *C. glabrata*), (*C. albicans* + *C. glabrata*) em discos de hidroxiapatita, polimetilmetacrilato (PMMA) e de um reembasador macio para próteses, com ou sem saliva. Realizou-se contagem de colônias em UFC/mL e microscopia confocal para caracterizar os biofilmes e quantificar o número de hifas em cada condição testada. O estudo mostrou que a formação de biofilme de *C. albicans* é influenciada por interação de múltiplas condições ambientais. A extensão e a morfologia da formação de biofilme podem depender do açúcar utilizado para o crescimento, do tipo de substrato, da presença de outros micro-organismos e da saliva. Observou-se que o *S. mutans* aumenta a formação de biofilme de *Candida*, e que a *C. albicans* possui sinergismo com *C. glabrata*. Estes resultados sugerem que não só pode haver estimulação do crescimento mútuo destes micro-organismos, mas também que eles podem agregar uns aos outros, o que pode melhorar o processo de aderência. Uma observação importante é o fato de *S. mutans* levar à supressão da formação de hifas de *C. albicans*. Segundo os autores, a compreensão da formação de biofilme sob diferentes condições, considerando especialmente a presença de outros micro-organismos, pode ser um fator chave no desenvolvimento de terapias para prevenir doenças relacionadas com a *Candida*.

Por meio de um estudo in vitro de 2008, Buegers et al.<sup>22</sup> compararam a eficácia de 10 métodos utilizados na desinfecção de próteses. Foram confeccionados corpos de prova de resina para reembasamento. Uma suspensão de *C. albicans* foi utilizada para contaminá-los. Então, 10 grupos foram obtidos: grupos que passaram por imersão durante 10 min em peróxido de hidrogênio 3%, hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído 2%, vinagre, Listerine Plax 0,3% (Triclosan) e perborato de sódio na forma de pastilha efervescente; grupo que passou por irradiação em micro-ondas durante 6 min, com ou sem imersão em água durante a irradiação e um grupo não submetido à desinfecção foi utilizado como controle positivo. A eficácia dos métodos foi avaliada através do método de intensidade da luminescência, sendo que, para isso, 100 µL de adenosina trifosfato de bioluminescência foram adicionados em cada corpo de prova e mantidos sobre eles durante 5 min. Após este período, a luminescência de cada amostra foi avaliada. Com base nos resultados, os autores observaram que não houve diferenças estatísticas significativas na desinfecção dos corpos de prova verificada no grupo controle quando comparada aos métodos de desinfecção com Plax,

peróxido de hidrogênio, glutaraldeído, vinagre, Listerine e irradiação por micro-ondas a seco. Entretanto, houve diferença significativa na efetividade de desinfecção entre o grupo controle e a imersão do corpo de prova em perborato de sódio efervescente, hipoclorito de sódio e a irradiação por micro-ondas com os corpos-de-prova imersos em água. Dessa forma, os autores concluíram que a utilização destes três métodos de desinfecção foi efetiva na redução da colonização de *C. albicans* nos materiais para base de prótese.

Silva et al.<sup>83</sup> (2008) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia de hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2%, glutaraldeído 2%, vinagre 100%, perborato de sódio 3,8% e pastilhas efervescentes Corega®Tabs na desinfecção de placas acrílicas contaminadas in vitro e verificar a ação destes desinfetantes sobre a rugosidade superficial destas placas acrílicas. Foram utilizados 350 corpos de prova de resina acrílica contaminados in vitro com suspensões de cepas padrão de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus subtilis*. Os corpos de prova (n=10) foram imersos nos desinfetantes por 10 minutos e o grupo controle não sofreu desinfecção. A seguir, foi realizada a contagem final de microrganismos em ufc/mL para avaliação do nível de redução microbiana. Os resultados foram comparados estatisticamente pelos testes ANOVA e Tukey (5%). Os resultados demonstraram que o hipoclorito de sódio 1%, glutaraldeído 2% e digluconato de clorexidina 2%, foram os mais efetivos para os microrganismos analisados, seguido pelo vinagre 100%, perborato de sódio 3,8% e Corega Tabs®. A rugosidade superficial dos corpos de prova após os ciclos de desinfecção com perborato de sódio 3,8% foi mais elevada e após os ciclos de desinfecção com digluconato de clorexidina apresentou uma diminuição.

No ano de 2009, Souza et al.<sup>85</sup> realizaram um estudo para avaliar o efeito do bicarbonato de sódio na adesão de *C. albicans* em resina acrílica, comparando-o com outras soluções desinfetantes mencionadas na literatura. Corpos de prova de resina acrílica termicamente ativada foram contaminados com *C. albicans* e incubados durante 24 h. A seguir, os corpos de prova foram lavados com água destilada e divididos em 5 grupos (n=10), de acordo com as soluções desinfetantes testadas: Grupo controle - água destilada; Grupo B - bicarbonato de sódio a 5%; Grupo V – vinagre branco; Grupo C – Corega Tabs; e Grupo P – digluconato de clorexidina a 0.12%. Para a desinfecção, os corpos de prova foram imersos durante 10 min em 10 mL da solução correspondente, de acordo com o grupo. As amostras foram, então, lavadas e agitadas em tubos de ensaio. As suspensões foram diluídas e plaqueadas para contagem de colônias em ufc/mL. Os grupos P e B apresentaram redução significativa nos valores de ufc/mL quando comparados ao grupo controle. Ainda, o grupo P apresentou redução microbiana significativa quando comparado aos grupos B, C e V. Os autores concluíram que a solução de digluconato de clorexidina a 0.12% apresentou o melhor resultado quando comparado com os demais produtos testados na redução da adesão de *C. albicans* na resina acrílica termicamente ativada. No entanto, a solução de bicarbonato de sódio a 5% pode ser uma alternativa viável para a higienização das próteses.

A presença de biofilme aderido sobre a superfície das próteses dentárias tem sido considerada o principal fator etiológico no aparecimento da estomatite protética. Desta forma,

Montagner et al.<sup>57</sup>, em 2009, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia antifúngica de diferentes agentes desinfetantes sobre amostras contaminadas com *C. albicans*. Para isso, 60 corpos de prova foram confeccionados com resina acrílica (Vipi Wave) e divididos em 5 grupos experimentais (n=10): G1: imersão em solução de clorexidina a 2% durante 10 min; G2: imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% durante 10 min; G3: imersão em hipoclorito de sódio modificado (50% v/v de hipoclorito de sódio 0,5% e álcool 96%) por 10 min; G4: imersão em Corega Tabs durante 5 min; e G5: imersão em peróxido de hidrogênio por 30 min. Após os processos de desinfecção, as amostras foram lavadas com solução salina e transferidas para tubos de ensaio contendo meio de crescimento, onde permaneceram durante 24 h. Em seguida, o grau de turbidez de cada meio de cultura foi avaliado para verificar a atividade antimicrobiana dos agentes testados. Também foi realizado um teste para verificar o crescimento celular. Neste, uma alíquota de cada tubo de ensaio foi transferida para uma placa contendo SDA e incubada por 24 h. Com os resultados, os autores observaram que houve diferença significativa entre os agentes testados. Os grupos G2, G3 e G5 não apresentaram diferença significativa entre si e foram mais eficazes que os grupos G1 e G4. Os autores concluíram que os agentes a base de hipoclorito de sódio e o peróxido de hidrogênio foram mais eficientes contra a *C. albicans* quando comparados a solução de clorexidina a 2% e o agente efervescente.

No ano de 2010, Vieira et al.<sup>91</sup> avaliaram a eficácia em longo prazo de produtos de limpeza para próteses na prevenção da recolonização por biofilme de *Candida spp.* sobre a superfície de uma resina. Os corpos de prova foram fabricados de polimetilmetacrilato e tiveram sua rugosidade superficial avaliada no início do estudo e após os tratamentos com as substâncias de limpeza. Os biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* foram formados na superfície dos corpos de prova durante 48 h e, em seguida, as amostras foram aleatoriamente distribuídas nos grupos: Polident (imersão durante 3 min), Efferdent (imersão durante 15 min), hipoclorito de sódio 0,5% (imersão por 10 min) ou água destilada (controle- imersão por 15 min). Após os tratamentos, as amostras foram sonicadas e as células residuais foram contadas (células/mL). Os resultados de estimativa de contagem de células mostraram diferenças significativas na limpeza entre os tratamentos. No entanto, não houve diferença significativa entre as espécies de *Candida* para a recolonização. Os limpadores de dentaduras alcalinos revelaram um desempenho de limpeza similar, e ambos diferiram do controle. Aumento de rugosidade superficial foi observado após todos os tratamentos. O hipoclorito de sódio foi o único tratamento que removeu o biofilme de forma eficiente, uma vez que não foram encontradas células viáveis após a sua utilização. Em conclusão, limpadores de dentaduras alcalinos de peróxido não foram eficazes na remoção de biofilme de *Candida spp.* das superfícies de resinas para próteses dentárias e não impediram a recolonização pelo seu biofilme.

O objetivo do estudo de Abaci et al.<sup>1</sup> (2010), foi determinar a incidência de *Candida spp.* na cavidade bucal de usuários de próteses e caracterizar predisponentes à estomatite protética. Três grupos de usuários de prótese total e um grupo de controle foram avaliados quanto à estomatite protética de acordo com a classificação de Newton. A quantidade de leveduras na saliva e em superfícies mucosas foram determinadas por métodos de fenotipagem, e o impacto de alguns fatores de risco no transporte de *Candida* foi avaliado. O desenvolvimento de estomatite protética é mais

comum em usuários de próteses totais. Quando a contagem de fungos na saliva é  $\geq 400$  ufc / mL, a frequência de estomatite protética é aumentada. Em indivíduos que desenvolvem estomatite protética, a espécie mais frequentemente encontrada é a *C. albicans*. A higiene das próteses foi relacionada com a intensidade de crescimento de *Candida* e com o desenvolvimento de estomatite protética. *C. albicans* vivem como saprófitas na cavidade oral, mas são capazes de causar infecção se houver predisposição de condições relacionadas ao hospedeiro. O uso de próteses removíveis pode causar a estes micro-organismos um ganho de patogenicidade.

Com o objetivo de comparar a eficácia da remoção de biofilme em procedimentos corriqueiros de higiene de prótese, Rossato et al.<sup>77</sup>, em 2011, selecionaram 15 estudantes, que foram divididos aleatoriamente nos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 e usaram aparelhos intrabucais maxilares por 24 h, sem limpá-los. Em seguida, os dispositivos foram submetidos aos seguintes procedimentos: P1: lavagem com água corrente durante 20 s; P2 e P3: limpeza com peróxido alcalino (Corega Tabs ®) durante 5 e 30 min, respectivamente; P4: escovação com água e sabão líquido durante 40 s; P5: hipoclorito alcalino durante 10 minutos; P6: solução de cloro de utilização doméstica (Q'boa® a 0,45% durante 10 minutos), por um período de 6 semanas consecutivas. Os procedimentos foram seguidos de um regime de circulação, de modo que todos os dispositivos foram submetidos a todos os métodos de higiene estudados. Após os procedimentos de higiene, os aparelhos foram corados, fotografados e submetidos ao método de pesagem. A partir dos resultados do estudo, concluiu-se que a utilização de hipoclorito alcalino é a melhor maneira de remover o biofilme, seguida pela solução de cloro de uso doméstico e da escovação com água e sabão líquido. A solução de Corega Tabs ® deve ser utilizada durante 30 minutos de imersão para ter uma eficácia de limpeza semelhante ao de hipoclorito alcalino.

O objetivo do estudo de André et al.<sup>4</sup> (2011) foi avaliar a incidência de estreptococos do grupo mutans (forma séssil) de próteses totais superiores após o uso de uma pasta específica para higienização de próteses totais, bem como determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e diluição inibitória máxima (DIM) de 3 enxaguatórios bucais: Cepacol, Plax e Periogard. Setenta e sete usuários de próteses totais foram distribuídos em 2 grupos: (A) grupo Controle: dentífrício convencional (Kolynos Super Branco) e (B) grupo Teste: pasta experimental para higiene de próteses (1). O biofilme das próteses foi coletado no início e após 90 e 180 dias dos tratamentos, por meio de escovação das próteses com solução salina. Após a diluição decimal seriada, as amostras foram semeadas em ágar sacarose bacitracina para a contagem de colônias características de estreptococos do grupo mutans. A identificação dos estreptococos do grupo mutans foi realizada por meio de testes de fermentação de açúcares. Após este procedimento, o caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) foi adicionado aos antissépticos (Plax, Cepacol e Periogard) e semeado em placas de Petri. As colônias foram semeadas usando o multiplicador de Steers e após a incubação, a concentração inibitória mínima e a concentração inibitória máxima dos enxaguatórios foram calculadas. Os resultados mostraram que a incidência de estreptococos do grupo mutans nas 77 próteses totais examinadas foi de 74,0% (n=57), sendo 76,3% (n=29) do grupo Controle (pasta convencional) e 71,8% (n=28) do grupo Teste (pasta experimental). Em ambos os grupos, o número

de casos positivos para estreptococos do grupo mutans diminuiu, do início (0 dias) para 180 dias. Houve uma pequena diminuição da incidência de *Streptococcus mutans* após 90 dias do uso da pasta experimental, o que não foi observado no grupo controle. Com relação aos enxaguatórios, para ambos os grupos, o Periogard apresentou atividade antimicrobiana com diluições maiores, seguido do Cepacol e Plax. Pôde-se concluir que a incidência de estreptococos do grupo mutans em próteses totais foi elevada e que o Periogard foi o enxaguatório com melhor ação antimicrobiana contra os estreptococos do grupo mutans. A pasta experimental mostrou uma pequena ação contra *S. mutans* após 90 dias de tratamento.

No mesmo ano, o estudo de Cruz et al.<sup>30</sup> avaliou a eficácia da remoção completa de biofilme em próteses através da utilização de produtos químicos (comprimidos de peróxido alcalino efervescente- Corega Tabs®), de método mecânico (ultrassom) e métodos combinados (associação de comprimidos efervescente e ultrassom). Usuários de próteses totais participaram do experimento por 21 dias. Eles foram distribuídos em quatro grupos (n = 20): G1- Escovação das próteses com água (controle); G2- comprimidos efervescentes (Corega Tabs®), G3- uso do dispositivo ultrassônico e G4- associação de comprimidos efervescentes e do dispositivo de ultrassom. Todos os grupos foram orientados a escovar as próteses com escova e água, três vezes ao dia, antes de aplicarem os seus tratamentos. O biofilme das próteses foi coletado no início e após 21 dias. Para quantificar o biofilme, as superfícies internas das próteses totais superiores foram coradas e fotografadas a 45 °. As fotos foram processadas e as áreas (superfície interna total corada com biofilme) quantificadas através de um software de processamento de imagens. A percentagem do biofilme foi calculada pela relação entre a área de biofilme multiplicada por 100 e a área total da superfície interna da prótese total superior. Os métodos experimentais foram igualmente eficazes em relação à capacidade de remoção do biofilme e foram superiores ao método controle (escovação com água). Segundo os autores, a imersão em peróxido alcalino e vibração ultrassônica podem ser usadas como agentes auxiliares para a limpeza de próteses totais.

Com o objetivo de avaliar a eficácia da remoção completa do biofilme formado sobre próteses usando solução de clorexidina em duas concentrações: 0,12% e 2%, de Andrade et al.<sup>33</sup> (2012), selecionaram sessenta usuários de próteses totais que foram distribuídos em três grupos: G1- Controle (imersão em água diariamente durante a noite), G2- imersão uma vez por dia em clorexidina 0,12% por 20 minutos após o jantar e G3- imersão uma única vez em solução de clorexidina 2%, durante 5 minutos. A porcentagem de biofilme foi quantificada na superfície interna de próteses totais superiores no início do estudo e após 21 dias. As superfícies internas das próteses totais superiores foram reveladas com 1% de solução de vermelho neutro. As superfícies foram fotografadas com uma câmera digital e flash. A área total e áreas correspondentes às regiões manchadas foram medidas usando um software de processamento de imagem. A percentagem de biofilme foi calculada usando a razão entre a área do biofilme multiplicada por 100 e área de superfície total da parte interna da base da prótese. Após o uso de cada método e após sua quantificação, o biofilme foi eliminado pela escovação com uma escova específica para próteses totais e sabonete líquido. Ambos os tratamentos à base de clorexidina tinham uma capacidade similar para remover o biofilme das

próteses. Os autores concluíram que a imersão em soluções de clorexidina de 0,12% ou 2% pode ser utilizada como um método auxiliar para a limpeza de próteses totais, pois nenhum efeito adverso ou manchas foram observados após a utilização de qualquer dos tratamentos, tal como observado através de exames clínicos.

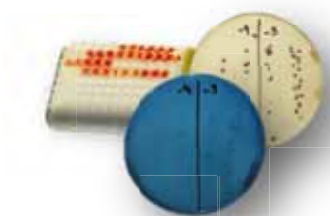
O rastreio de substâncias antimicrobianas necessita de uma avaliação tão rápida e simples quanto possível. Para este propósito, Koban et al.<sup>40</sup>, em 2012, realizaram um ensaio colorimétrico de sal de tetrazólio XTT convertido por biofilmes de saliva. A adequação do ensaio de XTT para detectar a vitalidade de biofilmes em saliva in vivo foi testada para determinar a eficácia da clorexidina e do ozônio contra biofilmes formados em discos de titânio. A sensibilidade do método exige um número diferente de bactérias planctônicas daquelas que ocorrem em biofilmes. O efeito antibacteriano após os testes com clorexidina e ozônio foram avaliados através do método de XTT. A eficácia antimicrobiana de 60 s de tratamento com clorexidina 0,5% e 0,1% foi igual e comparável com o tratamento com 60 s de ozônio. Concluiu-se que o ensaio XTT é um método adequado, fácil e rápido para determinar a vitalidade em biofilmes de saliva.

Para avaliar os mecanismos de interação entre os patógenos orais *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, Brusca et al.<sup>14</sup>, em 2012, estudaram a cinética de crescimento para os dois micro-organismos, cultivados individualmente ou em conjunto, durante 36 h. As curvas de crescimento foram analisadas por meio de modelagem matemática. Sob as condições experimentais, a concentração final de *S. mutans*, quando cultivados individualmente, era 5 vezes maior do que a concentração final de *C. albicans*. Contrariamente, quando ambos os micro-organismos cresceram juntos, esta razão foi invertida e a concentração final da *C. albicans* foi ainda mais elevada do que a de *S. mutans*. Quando ambos os micro-organismos são partes do nicho, um modelo incluindo a concorrência linear entre um e outro é mais adequado para reproduzir as observações experimentais. Os resultados deste modelo mostram que as taxas de crescimento iniciais de ambas as espécies são positivamente influenciadas pela sua interação mútua. No entanto, em tempos de incubação mais longos, a *C. albicans* impede o crescimento bacteriano e atinge concentrações 4 vezes mais elevadas do que quando são cultivados individualmente. Os resultados deste estudo sugerem que a formação de biofilme de *C. albicans* pode ser potencializada pela presença de *S. mutans* por dois mecanismos: sinergicamente por curtos períodos e pela concorrência em períodos mais longos.

A adesão de *Candida albicans* às superfícies é o primeiro passo para o desenvolvimento da estomatite protética. Uma adequada higienização é essencial para prevenir a formação de biofilme microbiano e o início desta infecção. Desta forma, o objetivo do estudo de Pellizzaro et al.<sup>69</sup> (2012) foi avaliar a efetividade da escovação com diferentes soluções na eliminação de biofilme de *C. albicans*. Para isso, discos de resina acrílica foram confeccionados, esterilizados e inoculados com uma suspensão de  $10^7$  células/mL de *C. albicans*. Após incubação (37°C/48 h), os espécimes foram aleatoriamente divididos em 10 grupos experimentais (n=9): 5 submetidos à escovação com água ou agentes de limpeza (água destilada, dentifício, digluconato de clorexidina (CHX) a 2%, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% e Polident fresh cleanse®) e 4 apenas imersos nos agentes de limpeza. Espécimes não submetidos à higienização foram utilizados como controle positivo. A viabilidade

celular foi verificada pelo teste de redução do XTT. Os resultados obtidos foram analisados pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). A escovação com todos os agentes de limpeza apresentou redução significativamente superior ( $p<0,0001$ ) na viabilidade do biofilme quando comparada à exposição dos espécimes às soluções. Escovação com CHX a 2% e NaOCl a 1% resultaram em 100% de inativação do biofilme. A exposição aos agentes de limpeza resultou em redução significativa ( $p<0,0001$ ) na viabilidade celular, com CHX a 2% sendo o mais efetivo ( $p<0,0001$ ). A utilização de agentes de limpeza em associação ao método de escovação provou ser efetivo para reduzir biofilme *C. albicans*, sendo as soluções de CHX e NaOCl as mais efetivas.

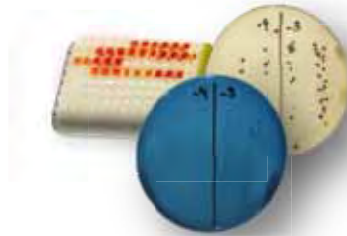




*Proposição*

### **3 PROPOSIÇÃO**

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da imersão e da escovação mecânica associada com agentes de limpeza na inativação de biofilme multiespécies em resinas acrílicas.



# *Material e método*

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 MATERIAIS

1. Água destilada;
2. Água Milli-Q;
3. Alças descartáveis calibradas para inoculação de micro-organismos, fabricadas pela Labplast, Corunha, Espanha;
4. Alça Drigalski, Quimi VidroLabor, Poá, São Paulo, Brasil;
5. Creme Dental Colgate Máxima proteção anticáries, fabricado por Colgate Palmolive Co., Osasco, SP, Brasil; Lote nº 9285BR121M;
6. Catalisador para silicone de condensação Zhermack Indurent Gel, fabricado pela Labordental LTDA, Moema, São Paulo, Brasil.
7. Cultura de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA (ATCC 900028);
8. Cultura de *Candida glabrata* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA (ATCC 2001);
9. Cultura de *Streptococcus mutans* da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA (ATCC 25175);
10. Corega Tabs®, fabricado por GlaxoSmithKline Brasil LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Lote nº LMG248V;
11. Escovas dentais da marca Colgate, do tipo macia, fabricada por Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil; Lote no 2175BR123B;
12. Folha de transparência, fabricada por Sercopel, São Paulo, SP, Brasil;
13. Gás de óxido de etileno (mistura de 30% de óxido de etileno e 70% de gás carbônico), produzido pela White Martins Ltda., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;
14. Gesso-Rio Creme tipo III, embalado e distribuído por Orlando Antônio Bussioli- ME;
15. Meio de cultura Mitis Salivaris Ágar (DIFCO, Detroit, MI, USA); Lote nº 2017870;
16. Meio de cultura CHRO Magar (DIFCO, Detroit, MI, USA); Lote nº 1305514;
17. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, produzido pela Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA; Cod A; Lote no 103,504;
18. Placas de Petri descartáveis estéreis, de 90 mm de diâmetro por 15 mm de altura, Prolab, São Jose dos Pinhais, PR, Brasil;
19. Placas de vidro jateadas, fabricadas pela ACP Comércio de Vidros LTDA EPP- Vidroplan-Araraquara-SP;
20. Pontas descartáveis para micropipeta da marca Axygen, Corning Life Sciences, New York, EUA;
21. Pontas maxicut nº 79, Edenta AG, Suíça;

22. Resina acrílica autopolimerizável para reembasamento imediato Tokuyama Rebase Fast II, fabricada pela Tokuyama Dental Corporation, Tokyo, Japan. Nº de lote: 078EZ0
23. Resina termopolimerizável Lucitone 550, Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil. Nº de lote: 446936D
24. Silicone de Condensação Zhermack, fabricado pela Labordental LTDA, Moema, São Paulo, Brasil.;
25. Solução de digluconato de clorexidina a 1%, fabricado pela Farmácia de Manipulação Arte & Ciência, Araraquara, SP, Brasil; Lote nº 135071/1;
26. Solução de ácido peracético 0,2% - Sterilife (Lifemed), fabricado por TECH desinfecção LTDA, Cotia, SP, Brasil; Lote nº TH13032120011;
27. Solução de Hipoclorito de sódio 1% - Solução de Milton, fabricada por Asfer Indústria Química Limitada, São Caetano do Sul, SP, Brasil; Lote nº 902;
28. Super Bonder, Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, São Paulo, Brasil;
29. Tubos Falcon 15 mL, estéreis, da marca TPP, Suíça;
30. Tubos Falcon 50 mL, estéreis, da marca TPP, Suíça.

#### **4.2 INSTRUMENTOS**

1. Alça de Drigalsky, fabricada pela Vidrolabor, Paulínia, SP, Brasil;
2. Béquer graduado, fabricado pela Vidrolabor, Paulínia, SP, Brasil;
3. Bico de Bunsen;
4. Caneta para retroprojeter, fabricada por Faber Castell, São Carlos, SP, Brasil;
5. Erlenmeyer graduado, fabricado pela Vidrolabor, Paulínia, SP, Brasil;
6. Espátula de aço no 36, marca Duflex, fabricada por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
7. Matrizes metálicas contendo 10 cavidades de 10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura;
8. Micropipeta de 1000-5000 $\mu$ L, fabricada por Boeco, Alemanha;
9. Micropipeta de 100-1000 $\mu$ L, fabricada por Boeco, Alemanha;
10. Micropipeta de 20-200 $\mu$ L, fabricada por Boeco, Alemanha.

#### **4.3 APARELHOS**

1. Agitador de tubos orbital, fabricado por Phoenix Indústria e Comercio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil; Modelo: AP 56; No9803;
2. Agitador de tubos, fabricado por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda; Piracicaba, SP, Brasil. Modelo: A 162. No8187148;
3. Autoclave vertical, fabricada pela Phoenix Industria e Comercio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil; Modelo: AV 60; N° 6614;
4. Balança de precisão, fabricada por Gehaka– Indústria e Comercio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, São Paulo, Brasil; Modelo: BG440; N°1010;

5. Balança de precisão, fabricada por Gehaka – Indústria e Comercio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, São Paulo, Brasil; Modelo: BG 400; N° 016450;
6. Câmara de autoclave para esterilização com oxido de etileno, fabricado pela LUTIS-Ferrando, Brasil; Modelo: 1800L; Especificação - LUTIS Ferrando 1800;
7. Câmara de fluxo laminar vertical, fabricada pela Pachane Indústria e Comercio Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil; Modelo: PA 115; N° 12898;
8. Contador de colônias CP 608 Plus, fabricado pela Phoenix Indústria e Comercio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil; Modelo: CP-608;
9. Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil; Modelo: MA 0324; Série – 9819011;
10. Estufa de cultura, fabricada por Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil; Modelo: 002CB;
11. Estufa Quimis, fabricada por Quimis Aparelhos científicos LTDA, Diadema, Sao Paulo, Brasil;
12. Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil; Modelo: MA 033; No9819;
13. Máquina de ensaios desenvolvida pela Disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, para a realização dos testes de escovação;
14. Prensa hidráulica, fabricada por Delta Maquinas Especiais, Vinhedo, SP, Brasil;
15. Rugosímetro Digital, fabricado por Mytutoyo Corporation, Tóquio, Japan; Modelo: SJ 400;
16. Termopolimerizadora, fabricada pela Solab Científica, Piracicaba- SP;
17. Centrifuga, fabricada por Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha; Modelo: 5810R
18. Espectrofotômetro Bio Photometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha;

#### **4.4 MÉTODO**

##### **4.4.1 Distribuição dos grupos**

Foram confeccionados 154 corpos de prova da resina Lucitone e 154 corpos de prova da resina Tokuyama para a avaliação da viabilidade do biofilme multiespécies. Destes, 144 passaram por testes de escovação e 144 passaram por testes de imersão. Os restantes foram utilizados como controles negativos (N=8) e positivos (N=12). Os corpos de prova foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n=12), de acordo com o quadro a seguir (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos experimentais para avaliação da viabilidade do biofilme. Araraquara, 2013.

<b>Materiais</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Agentes de limpeza</b>
<b>Lucitone/ Tokuyama (L/T)</b>	Escovação (E) 10s	água destilada (A); solução água/dentífrico (Colgate máxima proteção anticáries) - 1:1 (D); digluconato de clorexidina a 1% (Chx); hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl); perborato de sódio (CoregaTabs) (Pb); ácido peracético a 0,2% (Sterilife) (Ac).
<b>Lucitone/ Tokuyama (L/T)</b>	Imersão (I) 10s	água destilada (A); solução água/dentífrico (Colgate máxima proteção anticáries) - 1:1(D); digluconato de clorexidina a 1% (Chx); hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl); perborato de sódio (CoregaTabs) (Pb); ácido peracético a 0,2% (Sterilife) (Ac).

#### 4.4.2 Confeção dos corpos de prova

Para o desenvolvimento da pesquisa foram confeccionados corpos de prova da resina Lucitone 550 e da resina Tokuyama Rebase. Os corpos de prova foram obtidos utilizando-se matrizes metálicas, contendo cavidades de 10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura (Figura 1).

Figura 1- Matriz metálica contendo cavidades de 10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura. Araraquara, 2013.



As resinas foram incluídas entre duas placas de vidros jateadas com óxido de alumínio cuja rugosidade de aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$  simula a rugosidade encontrada na superfície interna de próteses<sup>75, 96</sup>.

Para a confecção dos corpos de prova de Lucitone 550, inicialmente, a parte inferior da mufla foi isolada e preenchida com gesso, sobre o qual foi posicionada uma placa de vidro de forma e tamanho compatíveis com as dimensões da matriz metálica. Após a presa do gesso, a matriz

metálica foi isolada com isolante para gesso em ambos os lados. Em seguida, a matriz metálica foi fixada com três gotas de cola Super Bonder sobre a placa de vidro. Silicone de condensação foi manipulado e posicionado ao redor da matriz para facilitar a sua remoção na fase de desinclusão e evitar a entrada de gesso pelas laterais da matriz. Outra placa de vidro foi fixada sobre a matriz com Super Bonder e a contra-mufla posicionada e preenchida com gesso.

Para a prensagem, a resina Lucitone 550 foi manipulada na proporção de 21 g de pó para 10 mL de líquido, de acordo com as orientações do fabricante. A matriz foi isolada com isolante para resina acrílica e, após a secagem do isolante, foi preenchida com a resina acrílica na fase plástica. A base da mufla foi coberta com uma folha de papel filme e fechada com sua porção superior para prensagem em prensa hidráulica com pressão inicial de 0,5 kg/f. No momento em que o ponteiro apresentou-se estabilizado em 0,5 kg/f, a pressão foi aumentada para 1,0 kg/f, até total escoamento do excesso de resina acrílica. Após o escoamento do excesso de resina, a mufla foi aberta, o papel filme removido e o excedente eliminado com auxílio de espátula Le Cron. A mufla foi novamente fechada e levada à prensa hidráulica com pressão de 1,5 kg/f pelo tempo de 2 horas. Após este período, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável e levada à termopolimerizadora digital para a polimerização da resina durante 90 minutos em água a 73°C. Decorrido este tempo, a temperatura foi elevada para 100°C, na qual a mufla permaneceu por mais 30 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a mufla foi aberta e os corpos de prova retirados, sendo os excessos removidos com o auxílio de uma ponta Maxi-Cut.

Para a confecção dos corpos de prova em resina Tokuyama Rebase Fast II, a matriz metálica foi fixada a um vidro jateado de tamanho proporcional à mesma com duas gotas de Super Bonder. Em seguida, a matriz foi isolada para facilitar a retirada dos corpos de prova. Após a secagem do isolante, o reembasador Tokuyama Rebase Fast II foi proporcionado (2,4 g de pó para 1 mL de líquido), manipulado de acordo com as instruções do fabricante e inserido nas cavidades da matriz com o auxílio de uma espátula nº 7. Em seguida, outra placa de vidro foi colocada sobre a matriz e pressionada contra ela, e aguardou-se a presa do material para que os vidros fossem retirados e a matriz fosse liberada para a obtenção dos corpos de prova. Os excessos de resina foram retirados com o auxílio de uma ponta Maxi-Cut.

#### **4.4.3 Medida da rugosidade superficial**

Após a obtenção dos espécimes, a rugosidade superficial foi mensurada com o intuito de padronizar as amostras e homogeneizar os grupos. A precisão de leitura do rugosímetro foi de 0,01  $\mu\text{m}$ , comprimento de leitura de 2,4 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s, e o raio da ponta ativa de 5  $\mu\text{m}$ . Foram realizadas quatro medidas para cada corpo de prova (duas de cada lado) e a média entre as leituras foi determinada como o valor da  $R_a$  ( $\mu\text{m}$ ). Selecionaram-se para os testes microbiológicos os corpos de prova que possuíam rugosidade superficial entre 2,7 e 3,7  $\mu\text{m}$ <sup>75,96</sup>.



#### 4.4.4 Esterilização dos corpos de prova

Previamente aos testes microbiológicos, os corpos de prova e as porções ativas das escovas dentais foram esterilizados por meio de óxido de etileno (ACECIL – Central de Esterilização Comércio e Indústria Limitada, Campinas, São Paulo, Brasil). Este procedimento foi adotado por preservar as propriedades da resina acrílica<sup>48</sup>.

#### 4.4.5 Inóculos e meios

Foram utilizados os micro-organismos *S. mutans* ATCC 25175, *C. albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC 2001. Para o preparo do inóculo, o *S. mutans* foi semeado em cultura Mitis Salivaris Bacitracina (MSB), constituído de 90 gramas do meio Mitis Salivaris, 150g de sacarose, 1000 mL de água destilada e 0,004 g de bacitracina para 1 mL de água Milli-Q, a uma temperatura de 37°C em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10% por 48 horas. As espécies de *Candida* foram semeadas em placas de Petri sobre o meio de cultura Ágar Sabouraud com cloranfenicol (SDA) e incubadas a 37°C por 48 horas, em atmosfera de aerobiose. Após este período de ativação, uma alçada da bactéria ou das leveduras recém-cultivadas foi adicionada em frascos contendo, respectivamente, 10 mL de meio Brain Heart Infusion caldo (BHI), para *S. mutans*, e 10 mL de Yeast Nitrogen Base (YNB) adicionado de glicose 50 mM, para as espécies de *Candida*. Após a incubação em agitador orbital a 37°C por 18 horas em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10% para o *S. mutans* e por 21 horas para as espécies de *Candida*, as células foram centrifugadas a 5.000 rotações por min em uma centrífuga, durante 5 min, e lavadas duas vezes com PBS estéril (NaCl 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,2) por meio de agitação e centrifugação a 5.000 rotações por min., durante 5 min. As células lavadas, tanto da bactéria quanto das leveduras, foram ressuspensas em 10 mL de caldo BHI estéril. A densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada a uma concentração de 1x10<sup>8</sup> células/mL para o *S. mutans*<sup>72</sup> e de 1x10<sup>7</sup> células/mL para as espécies de *Candida*<sup>72</sup>, utilizando-se espectrofotômetro (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil). A absorvância mensurada para o *S. mutans* foi de 0,1 a 600 nm e para as espécies de *Candida* foi de 0,6 a 520 nm.

#### 4.4.6 Formação do biofilme

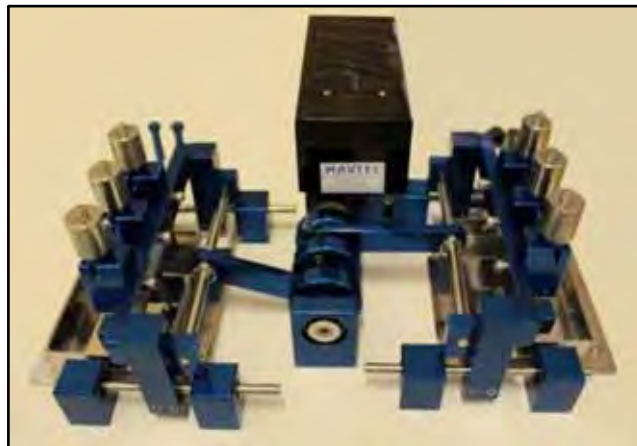
O biofilme multiespécies foi formado em placas de cultura estéreis de 24 orifícios. Alíquotas iguais da suspensão celular padrão de cada micro-organismo, totalizando 2 mL, foram transferidas para cada orifício contendo um corpo de prova, e então as placas foram incubadas por 90 minutos (fase de aderência). Durante este período, as placas de cultura de células com os corpos de prova foram mantidas em um agitador orbital a 37 °C sob agitação de 75 rotações por minuto (rpm), em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10%. Após a fase de aderência do biofilme, cada corpo de prova foi cuidadosamente removido de seu poço e lavado duas vezes por inserção suave em novos poços contendo 2 mL de PBS estéril. Essa lavagem foi realizada com a função de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos. Em seguida, 2 mL de BHI estéril foram adicionados em cada orifício com o objetivo de fornecer mais nutrientes para os micro-organismos, e

as placas foram novamente mantidas a 37 °C sob agitação de 75 rpm, em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10%, durante 48 horas.

#### 4.4.7 Ensaio de escovação

Os ensaios de escovação foram realizados em uma máquina de escovação com seis pontos de teste (Figura 2).

Figura 2 - Máquina de escovação simulada. Araraquara, 2013.



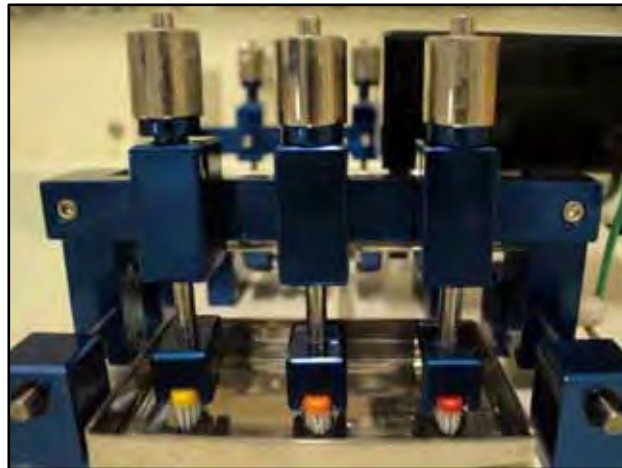
Esta máquina apresenta duas bases horizontais acrílicas removíveis, com três cavidades circulares em cada base, nas quais os corpos de prova foram posicionados durante os ensaios de escovação. Essas cavidades circulares apresentam as mesmas dimensões dos corpos de prova, permitindo o seu correto encaixe e apreensão durante os testes. As bases horizontais acrílicas ficam posicionadas no interior de dois compartimentos quadrangulares com uma parede metálica de 33 mm de altura. Esta moldura contorna as bases horizontais acrílicas, gerando um compartimento que contém os agentes de limpeza permitindo, assim, que os corpos de prova permaneçam imersos durante a execução dos ensaios de escovação (Figura 3).

Figura 3 – Base horizontal acrílica removível onde se encaixam os corpos de prova durante os ensaios de escovação. Araraquara, 2013.



Na parte central da máquina, encontra-se o motor unido a dois braços metálicos que acoplam seis dispositivos metálicos (três em cada braço), os quais permitem o encaixe das partes ativas das escovas dentais. Esses dispositivos apresentam, superiormente, pinos metálicos sobre os quais são colocados cilindros confeccionados em latão. A função dos cilindros é exercer força constante de 200 g sobre as porções ativas das escovas durante os testes de escovação (Figura 4).

Figura 4 – Escovas dentais e cilindros de latão em posição. Araraquara, 2013.



O compartimento presente na base horizontal foi preenchido com 150 mL de cada agente de limpeza, sendo que, para cada produto testado, as escovas de dente foram trocadas e os dispositivos nos quais os corpos de prova se encaixaram foram esterilizados em micro-ondas (3 minutos a 650 W). O acionamento do motor induz a movimentação do conjunto braço metálico dispositivo das escovas dentais, realizando movimentos cíclicos horizontais de amplitude controlada, permitindo um deslocamento linear das escovas de 18 mm para cada lado. O ensaio da escovação foi realizado em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com raios ultravioleta durante 20 minutos.

#### 4.4.8 Grupos experimentais

Após a formação do biofilme de 48h, os corpos de prova foram divididos aleatoriamente nos grupos de estudo (n=12) que compõe o Quadro 1. Os corpos de prova do controle positivo foram contaminados, imersos em água destilada durante 10 segundos e mantidos em meio BHI durante 48 horas. Para o controle negativo, corpos de prova estéreis foram adicionados à placa de cultura em cada ocasião realizada, permanecendo em contato apenas com o meio de cultura estéril durante 48 horas. Os grupos experimentais foram submetidos à escovação durante 10 segundos com os seguintes agentes de limpeza: água destilada; solução água/dentífrico - 1:1; digluconato de clorexidina a 1%; hipoclorito de sódio a 1%; perborato de sódio (CoregaTabs); e ácido peracético a 0,2%. Nos demais grupos experimentais, os corpos de prova foram submetidos à imersão durante 10 segundos nos mesmos agentes de limpeza, com o objetivo de avaliar isoladamente a ação química destes agentes sobre o biofilme. Para a imersão dos corpos de prova nas soluções anteriormente descritas, compartimentos das placas de cultura estéreis de 24 orifícios foram preenchidos com 2 mL

de cada solução testada e os corpos de prova foram imersos nas mesmas pelo período de 10 segundos.

#### 4.4.9 Ensaio de XTT

Para a avaliação dos micro-organismos que permaneceram após os procedimentos de limpeza, todos os corpos de prova foram submetidos ao ensaio de redução de 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT). O teste com XTT baseia-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de leveduras metabolicamente ativas converterem o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em um produto solúvel em água - formazan (cor laranja), o que é mensurado em espectrofotômetro. Para o ensaio, duas soluções foram utilizadas: solução de XTT e a solução de menadiona. A solução de XTT foi preparada utilizando-se água ultra pura a uma concentração de 1 mg/mL e mantido a -70 °C até o momento do experimento. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM, imediatamente antes da sua utilização.

Todos os corpos de prova foram individualmente transferidos para novas placas de cultura de células estéreis com 24 orifícios contendo 2 mL da seguinte solução: 158 µL de PBS a 200 mM de glicose, 40 µL de solução de XTT previamente preparada e 2 µL de menadiona. As placas foram incubadas a 37°C por 3 horas e, após esse período, a solução presente em cada orifício foi homogeneizada com uma pipeta. A seguir, uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para um eppendorf e centrifugada a 5.000 rpm durante 2 minutos para a precipitação das células. Posteriormente, 200 µL do produto da degradação do XTT (sobrenadante) foram transferidos para os orifícios de uma placa de leitura (Elisa) (Figura 5) e o resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro 492 nM.

Figura 5 - Produto da degradação do XTT após 3 h de incubação em uma placa de elisa para leitura em espectrofotômetro. Araraquara, 2013.



#### 4.4.10 Contagem do número de colônias viáveis

Para a quantificação de micro-organismos após os ensaios de escovação e imersão, os corpos de prova foram transferidos para tubos Falcon contendo 4,5 mL de PBS puro e agitados durante 1 minuto em vórtex para o desprendimento dos micro-organismos. Em seguida, o processo de diluição seriada foi realizado em tubos eppendorf contendo 900  $\mu\text{L}$  de PBS puro por meio da transferência de alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da solução original. As diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram obtidas. Duas alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  da diluição de  $10^{-3}$  e de  $10^{-4}$  foram gotejadas em placas de Petri contendo CHRO-Magar (Figura 6) e em placas contendo Mitis Salivaris (Figura 7). As gotas foram escorridas pela placa de forma que não se encontrassem. A seguir, todas as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As placas de Mitis Salivaris foram incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$ . Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias manual e o número de colônias determinado. Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:  $\text{ufc/mL} = \text{número de colônias} \times 10^n / q$ . Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 3 a 4) e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas (0,010 mL = 10  $\mu\text{L}$ ).

Figura 6 – Placas de CHROMagar. A placa da esquerda mostra crescimento intenso de *Candida albicans* (colônias verdes) e *Candida glabrata* (colônias roxas) quando foi feita a imersão em água destilada. A placa da direita mostra a ausência de crescimento de Candidas quando a escovação combinada com ácido peracético a 0,2% foi realizada. Araraquara, 2013.

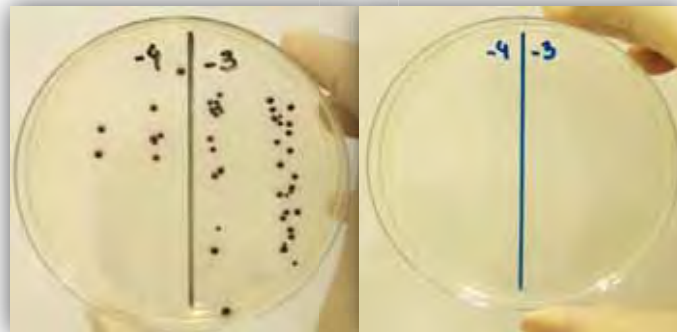
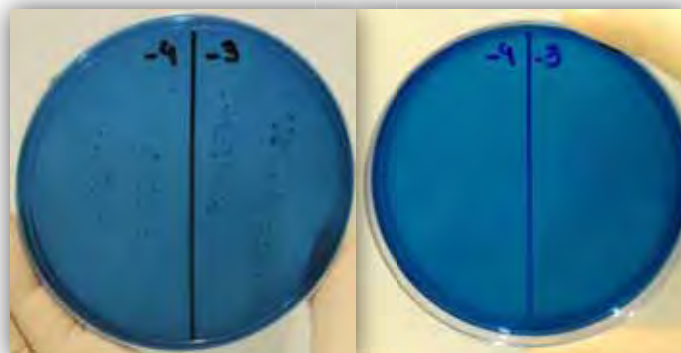
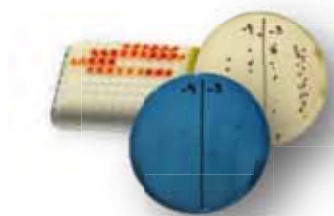


Figura 7 – Placas de Mitis salivaris. A placa da esquerda mostra crescimento intenso de *Streptococcus mutans* (colônias azuis) quando foi feita a imersão em água destilada. A placa da direita mostra a ausência de crescimento de *S. mutans* quando a escovação combinada com ácido peracético a 0,2% foi realizada. Araraquara, 2013.



#### **4.5 Planejamento estatístico**

Análise da variância (ANOVA) foi realizada para a análise comparativa entre os métodos de limpeza. Os resultados obtidos com os agentes de limpeza para cada método foram avaliados através do teste de Tukey da diferença honestamente significativa (HSD de Tukey) para comparações post hoc ( $\alpha = 0,05$ ). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a um nível  $\alpha$  de 0,05.



*Resultado*

## 5 RESULTADO

Os valores de absorvância, desvios padrão e a porcentagem de redução da viabilidade do biofilme multiespécies para todos os grupos experimentais e para ambas as resinas em estudo estão apresentados na Tabela 1. A média de absorvância (DO 492nm) obtida no grupo controle positivo foi de 1,908 para a resina Lucitone e de 1,854 para a resina Tokuyama (Apêndice A<sub>1</sub>).

Os grupos experimentais que apresentaram médias altas (AE- L e T, AI- L e T, DE- L e T, DI- L e T, PbE- T e Pbl - L e T), acima de 8% do valor do controle positivo, foram submetidos à análise de variância (Apêndices A<sub>8</sub> e A<sub>9</sub>). Esta acusou diferenças significativas entre médias dos grupos ( $p < 0,001$ ), identificadas posteriormente pelo teste de Tukey, conforme anotado na Tabela 1.

As soluções de Ac, NaOCl e Chx foram as mais eficientes para ambas as resinas, reduzindo a viabilidade do biofilme acima de 99,5%, independentemente do método de limpeza empregado.

Tabela 1 – Médias, desvios padrão e porcentagem de redução da viabilidade do biofilme multiespécies pelo teste XTT de acordo com o método (escovação; imersão) e agente de limpeza para cada material em estudo. Araraquara, 2013.

Tratamento	Agente	Lucitone			Tokuyama		
		Média	DP	(%)	Média	DP	(%)
Escovação	A	0,076	0,049	96,1 <sup>a</sup>	0,123	0,080	93,6 <sup>a</sup>
	Ac	0,000	0,000	100,0	0,004	0,005	99,9
	Chx	0,009	0,007	99,5	0,005	0,003	99,7
	D	0,067	0,018	96,5 <sup>a</sup>	0,136	0,034	92,9 <sup>a</sup>
	NaOCl	0,002	0,004	99,9	0,007	0,007	99,6
	Pb	0,014	0,012	99,2	0,050	0,019	97,4 <sup>a</sup>
Imersão	A	1,395	0,210	26,9 <sup>c</sup>	1,468	0,219	23,1 <sup>c</sup>
	Ac	0,004	0,006	99,8	0,004	0,004	99,8
	Chx	0,004	0,004	99,8	0,006	0,008	99,8
	D	0,083	0,024	95,7 <sup>a</sup>	0,322	0,163	83,2 <sup>b</sup>
	NaOCl	0,002	0,003	99,9	0,017	0,013	99,1 <sup>a</sup>
	Pb	0,326	0,153	83,0 <sup>b</sup>	0,343	0,157	82,1 <sup>b</sup>
	C+	1,908	0,207		1,854	0,223	<sup>d</sup>

C+= Controle positivo; A= água; Ac= ácido peracético; Chx= clorexidina 1%; D= dentífrico; NaOCl= Hipoclorito de sódio 1% e Pb= Perborato de sódio.

Médias acompanhadas de letras iguais (para cada material) não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey com  $p < 0,05$  (médias próximas de zero, inferiores a 8% do controle positivo, não entraram na comparação).

Na Tabela 2 são mostradas as médias e desvios padrão de logaritmos decimais de contagens de colônias, em ufc/mL, dos micro-organismos *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*, de acordo com o método de higienização, escovação ou imersão em: água destilada (A); ácido peracético (Ac), clorexidina 1% (Chx), dentífrico (D), hipoclorito de sódio (NaOCl) e perborato de sódio (Pb), relativamente às resinas Lucitone e Tokuyama. Alguns grupos experimentais apresentaram contagens de micro-organismos em todas as suas amostras iguais a zero, mostrando eficiência dos



tratamentos correspondentes na inativação dos mesmos. Então, somente as médias dos grupos restantes foram submetidas à análise estatística.

Quanto a *Candida albicans*, as análises de variância relativas aos materiais Lucitone e Tokuyama, apontaram efeitos significativos dos grupos sobre os logaritmos de ufc/mL ( $p < 0,001$  nos dois casos), como descrito nos Apêndices A<sub>10</sub> e A<sub>11</sub>. O resultado da aplicação do teste de Tukey está resumido na Tabela 2, podendo-se estabelecer entre as médias a desigualdade:  $D(I) < [C(I) = Pb(I)] < C+$  para os dois materiais. Apesar da significância estatística, todas essas médias são da ordem de dez elevado a 5 ou 6, enquanto as médias restantes são nulas.

Em relação à *Candida glabrata*, para o material Lucitone, a análise de variância apontou efeito significativo de grupos ( $p < 0,001$ ) (Apêndice A<sub>12</sub>), sendo aplicado o teste de Tukey, com o resultado resumido na Tabela 2. Neste caso, a relação entre as médias maiores do que zero é:  $[D(I)=C(I)] < [Pb(I)=C+]$ . Mas, para o Tokuyama não houve evidência de efeito significativo de grupos ( $p=0,443$ ) (Apêndice A<sub>13</sub>), estabelecendo-se pelo teste de Tukey a seguinte igualdade entre médias:  $D(I) = C(I) = Pb(I) = C+$ . É importante destacar que aqui também as médias de contagens foram da ordem de dez elevado a 5 ou 6, enquanto todas as outras foram iguais a zero.

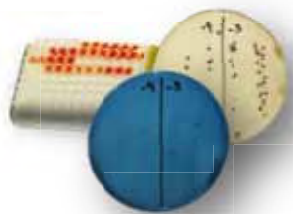
Para o micro-organismo *Streptococcus mutans*, as análises de variância não apontaram efeito significativo de grupos, tanto para o Lucitone como para o Tokuyama ( $p=0,058$  e  $p=0,327$  respectivamente), como descrito nos Apêndices A<sub>14</sub> e A<sub>15</sub>. Agora se tem para as médias a igualdade:  $A(E)=C(I)=Chx(I)=D(I)=PB(I)=C+$ , as quais são da ordem de 10 elevado a 6 ou 7, enquanto as médias restantes são nulas.

Os valores originais (ufc/mL) das médias das triplicatas e os logaritmos de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans* para as resinas Lucitone e Tokuyama encontram-se nos Apêndices A<sub>2</sub>-A<sub>7</sub>.

Tabela 2 - Médias (desvios padrão) de logaritmos decimais de ufc/mL, de acordo com o método (E: escovação; I: imersão) e agente de limpeza para cada material e micro-organismo em estudo. Araraquara, 2013.

Material e agente	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>S. mutans</i>	
	E	I	E	I	E	I
<b>Lucitone</b>						
<b>A</b>	-	5,92 <sup>c</sup> (0,14)	-	6,89 <sup>b</sup> (0,55)	6,92 <sup>a</sup> (0,93)	7,32 <sup>a</sup> (1,25)
<b>Ac</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Chx</b>	-	-	-	-	-	6,50 <sup>a</sup> (0,89)
<b>D</b>	-	5,04 <sup>a</sup> (0,22)	-	5,42 <sup>a</sup> (0,42)	-	6,92 <sup>a</sup> (0,86)
<b>NaOCl</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Pb</b>	-	5,54 <sup>b</sup> (0,16)	-	5,60 <sup>a</sup> (0,35)	-	6,97 <sup>a</sup> (0,87)
<b>C+</b>	6,04 <sup>c</sup> (0,26)		6,56 <sup>b</sup> (0,25)		7,70 <sup>a</sup> (0,94)	
<b>Tokuyama</b>						
<b>A</b>	-	6,15 <sup>b</sup> (0,16)	-	6,25 <sup>a</sup> (0,16)	6,40 <sup>a</sup> (0,99)	7,05 <sup>a</sup> (1,02)
<b>Ac</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Chx</b>	-	-	-	-	-	7,13 <sup>a</sup> (0,55)
<b>D</b>	-	5,30 <sup>a</sup> (0,24)	-	6,32 <sup>a</sup> (0,06)	-	7,25 <sup>a</sup> (1,20)
<b>NaOCl</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Pb</b>	-	5,95 <sup>b</sup> (0,21)	-	6,36 <sup>a</sup> (0,17)	-	7,03 <sup>a</sup> (0,96)
<b>C+</b>	6,53 <sup>c</sup> (0,35)		6,34 <sup>a</sup> (0,16)		7,05 <sup>a</sup> (0,94)	

C+= Controle positivo; A= água; Ac= ácido peracético; Chx= clorexidina 1%; D= dentífrico; NaOCl= Hipoclorito de sódio 1% e Pb= Perborato de sódio. Médias acompanhadas de letras iguais (para cada combinação de material e micro-organismo) não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey com  $p < 0,05$  (médias iguais a zero não entraram na comparação)



*Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

O biofilme em próteses tem sido definido como uma associação de micro-organismos cercados por metabólitos e componentes salivares. Entre estes micro-organismos, os *Streptococcus mutans* se destacam, uma vez que iniciam a formação de biofilme e facilitam a aderência de leveduras na mucosa e dentaduras<sup>4</sup>. Brusca et al.<sup>14</sup> (2012) consideram que a infecção prévia da cavidade oral com *Streptococcus mutans* pode facilitar e até mesmo promover a colonização por *Candida albicans*.

Uma apropriada higiene tem sido recomendada para a manutenção da saúde bucal, prevenção do aparecimento de infecções oportunistas, como a estomatite protética, e preservação da prótese. Entre os métodos de higienização, a escovação mecânica tem sido mais utilizada para a remoção do biofilme<sup>51,67</sup>, contudo, para os indivíduos portadores de deficiência motora ou hospitalizados, a desinfecção química poderia ser uma opção viável. Vários estudos sobre a eficácia desses métodos na remoção do biofilme e seus efeitos sobre as propriedades dos materiais têm sido realizados<sup>20, 39, 59, 62</sup>. No entanto, dúvidas ainda permanecem com relação ao tempo de imersão da prótese mais apropriado para que os agentes de limpeza sejam eficazes sem alterar as propriedades dos materiais. Assim, este estudo avaliou por meio do teste XTT e contagem de colônias, a inativação de um biofilme multiespécies após a imersão ou escovação combinada com agentes de limpeza durante 10 segundos.

O tempo limite para a execução da escovação é bastante variável e não bem definido na literatura. Paraskevas et al.<sup>67</sup> utilizaram o tempo de 2 minutos por hemiarcada, com resultados positivos na redução do biofilme. Neste estudo, levando-se em consideração o tamanho dos corpos de prova (10 x 2 mm) e o tempo médio de escovação de uma arcada, concluímos que o tempo de 10 segundos seria o suficiente para a avaliação do efeito dos agentes de limpeza e da escovação com eles sobre a redução da viabilidade de biofilme multiespécies nos corpos de prova de resinas acrílicas.

O ensaio de XTT é essencialmente um ensaio colorimétrico de viabilidade celular importante para o estudo da atividade de células eucarióticas<sup>41</sup>. Porém, seu uso vem sendo observado também para a detecção de bactérias<sup>3, 37, 40</sup>. Para converter XTT, os micro-organismos necessitam de vários aditivos que funcionam como carregadores de elétrons. O aditivo padrão para *Candida* spp. é a menadiona<sup>40</sup> e para as bactérias gram positivas cocos, por vezes, a menadiona também é usada<sup>3</sup>. O ensaio de XTT mede indiretamente a atividade bacteriana avaliando a atividade do sistema de transporte de elétrons (STE), para isso usa receptores de elétrons artificiais, ou seja, corantes redox que podem competir com sucesso por elétrons com o oxigênio. O XTT é reduzido pelas enzimas desidrogenases presentes no sistema STE de bactérias em corante formazan solúvel em água, e a absorbância pode ser medida pelo espectrofotômetro<sup>3</sup>.

No presente estudo, o teste de XTT mostrou uma redução de 96,1% do biofilme na resina L e 93,6% na resina T quando foi realizada a escovação com água. Estes valores corroboram com o estudo de Pellizzaro et al.<sup>69</sup>, em 2012, que encontraram redução de 96% quando da escovação de corpos de prova de resina com água. Considerando que a água destilada não apresenta efeitos

químicos antimicrobianos, a remoção dos micro-organismos estaria relacionada à ação mecânica exercida pelas cerdas da escova em contato direto com o biofilme e às forças hidrodinâmicas do atrito resultantes do fluxo de líquido durante o procedimento da escovação, resultando em sua ruptura mecânica<sup>53</sup>. Sabe-se que as resinas para reembasamento imediato, como a Tokuyama, são mais porosas que as resinas termopolimerizáveis convencionais<sup>16, 61</sup>, o que poderia favorecer a colonização por micro-organismos. Por outro lado, a imersão em água mostrou-se ineficaz na redução do biofilme (26,9% em L e 23,1% em T), ficando evidente que a ação mecânica exercida pelas cerdas da escova foi fundamental para a remoção do biofilme. Neste estudo foi observado que a escovação com água foi capaz de remover totalmente os micro-organismos *Candida albicans* e *Candida glabrata*, porém foi ineficaz na remoção do *Streptococcus mutans* em ambas as resinas. Uma provável explicação para este resultado seria que a escovação por 10 segundos foi suficiente para remover o biofilme mais superficial formado por *Candida*, mas não foi suficiente para remover o biofilme formado por *S. mutans*, aderido inicialmente aos corpos de prova.

O ácido peracético é reconhecido internacionalmente como um potente agente esterilizante e não há relatos de resistência microbiana a este princípio ativo. Segundo o fabricante do ácido peracético Sterilife®, a ação sinérgica de seus principais componentes (peróxido de hidrogênio e ácido peracético) destrói fungos, vírus e bactérias em forma vegetativa, através de uma reação de oxidação das ligações SS (pontes de sulfeto) e SH (sulfeto e hidrogênio) presentes na membrana celular, citoplasma e material genético dos micro-organismos, quebrando ligações vitais e destruindo-os. Penetram no conteúdo citoplasmático, oxidando enzimas essenciais, bloqueando sequências bioquímicas fundamentais para a reprodução e sobrevivência dos micro-organismos. Ao contrário da maioria dos desinfetantes químicos, não se torna inativo na presença de matéria orgânica<sup>26</sup>. Embora relativamente citotóxico<sup>80</sup>, este desinfetante não deixa resíduo e não produz subprodutos prejudiciais, porque seu mecanismo de ação envolve a liberação de oxigênio livre e radical de hidroxila decomposto em oxigênio água e ácido acético<sup>78</sup>. O ácido peracético reduziu, em associação com a escovação, 100% do biofilme em L e 99,9% em T. Já a imersão em Ac produziu 99,8% de redução em ambas as resinas. Estes resultados nos mostram que o ácido peracético é muito eficiente contra os micro-organismos, e seu uso pode dispensar a ação mecânica das cerdas da escova no caso de pacientes com dificuldades para realizar a escovação, por exemplo. Embora o tempo de imersão recomendado pelo fabricante para a esterilização seja de 20 minutos, através desta pesquisa foi possível observar que apenas 10 segundos já foram suficientes para eliminar o biofilme formado por *C. albicans*, *C.glabrata* e *S.mutans* sobre corpos de prova de resinas acrílicas. Um aumento da rugosidade superficial foi observado após imersão de resinas acrílicas em ácido peracético a 2% durante 30 min, por outro lado, não foram verificadas mudanças significantes na cor das resinas antes de 60 minutos<sup>36</sup>, mostrando que talvez este agente de limpeza a 0,2% possa ser usado sem causar danos às propriedades físicas e mecânicas de resinas acrílicas em curtos períodos de contato. No entanto, estudos avaliando o efeito do ácido peracético na cor e rugosidade de resinas acrílicas, utilizando-se a concentração de 0,2%, em imersão ou em associação com a escovação, pelo período de 10 s, ainda precisam ser realizados.

A solução de digluconato de clorexidina é considerada um antisséptico de amplo espectro que atua sobre bactérias gram positivas, gram negativas, fungos e leveduras. Apresenta grande afinidade às paredes celulares dos micro-organismos, aos mucopolissacarídeos salivares e à hidroxiapatita<sup>34</sup>. O mecanismo de ação antimicrobiano da clorexidina é explicado pelo fato de sua molécula catiônica ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção dependente da concentração<sup>17</sup>. Por outro lado, a solução de digluconato de clorexidina apresenta alguns efeitos adversos, sendo eles manchamento, alteração da cor dos dentes artificiais e da base da prótese, além de alteração do paladar<sup>10, 19, 34, 55, 85</sup>. Entretanto, a clorexidina é estável, não é tóxica aos tecidos, a absorção pela mucosa e pele é mínima, não provoca efeitos tóxicos colaterais sistêmicos com o uso prolongado, bem como alterações na microbiota oral<sup>23</sup>. A escovação com digluconato de clorexidina a 1% por 10 s foi capaz de reduzir 99,5% do biofilme em L e 99,7% em T. Já a imersão por 10 s neste agente de limpeza foi capaz de reduzir 99,8% do biofilme em L e T. Pellizzaro et al.<sup>69</sup> obtiveram uma redução de 100% do biofilme de *Candida* tanto na imersão quanto na associação da escovação com a Chx. Porém, no estudo mencionado, o tempo de imersão/escovação utilizados foi superior (90 s), assim como a concentração da Chx (2%). Apesar da ação mecânica da escovação, os resultados do presente estudo podem ser atribuídos, principalmente, ao efeito químico da solução sobre as células fúngicas<sup>52</sup>. MacNeill et al.<sup>52</sup> (1997) observaram que, após contato com digluconato de clorexidina, as células de *C. albicans* apresentaram severas degenerações do citoplasma (fragmentação e aglutinação dos componentes, vacuolização, acúmulo de lipídios e condensação), fragmentação e descamação da parede celular, resultando em morte celular. Resultados de estudos in vitro demonstraram a eficácia dessa solução sobre diferentes micro-organismos<sup>83, 85</sup>, enquanto que, em estudos in vivo, a escovação com este agente apresentou resultados positivos na redução do biofilme e gengivite<sup>9, 10, 33, 34</sup>. Considerando que os efeitos adversos desse agente de limpeza são determinados pelo tempo de exposição e concentração da solução<sup>58, 73</sup>, estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano do digluconato de clorexidina em concentrações e tempos de exposição reduzidos. Exposição a esse agente de limpeza a 2% por períodos de exposição inferiores (3 e 10 min) mostrou-se efetiva na inativação de biofilmes maduros de diferentes micro-organismos<sup>57, 84</sup>. No presente estudo, o tempo de imersão/escovação reduzido (10 s), com menor concentração da Chx (1%), além de mostrar-se eficaz na inativação biofilme de multiespécies, poderia reduzir alguns efeitos colaterais do digluconato de clorexidina, como gosto desagradável<sup>9</sup> e manchamento dos dentes e da prótese<sup>9, 10</sup>. A Tabela 2 mostra que a associação da clorexidina a 1% com escovação por apenas 10 s foi capaz de inativar as colônias de todos os micro-organismos em estudo. Da mesma forma, a imersão por 10 s em digluconato de clorexidina a 1% foi capaz de inativar as colônias de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, não sendo eficaz, no entanto, contra *Streptococcus mutans*. Em 1998, Pratten et al.<sup>74</sup>, em um estudo in vitro, avaliaram a eficácia da clorexidina sobre a vitalidade de bactérias agrupadas em biofilmes. Após a confecção de biofilmes compostos por bactérias coletadas do biofilme dental, os autores expuseram esses biofilmes a

soluções de 0,2% de clorexidina por 1, 5 e 60 min. Os resultados mostraram que os biofilmes expostos a 1 min e 5 min ao antimicrobiano não apresentaram efeito significativo na redução da vitalidade bacteriana. No entanto, houve uma redução estatisticamente significativa na contagem de células bacterianas vitais após 60 min de exposição ao produto. Dessa forma, fica claro que a ação da clorexidina sobre o biofilme oral depende do tempo de exposição ao antimicrobiano e que o tempo de 10 s, usado neste estudo, pode justificar a ausência da redução do número de colônias de *S. mutans*.

A Tabela 1 mostra que a escovação com dentífrico reduziu o biofilme em 96,5% na resina L, e em 92,9% na resina T. Pellizzaro et al.<sup>69</sup> encontraram um valor maior de redução, 98%. Levando-se em consideração que no estudo citado o biofilme era formado apenas por *Candida albicans*, os resultados encontrados no presente estudo são justificáveis, pois o biofilme multiespécies tem uma composição mais complexa, e quanto mais complexa a composição dos biofilmes, mais resistentes são aos procedimentos de desinfecção<sup>70</sup>. Na imersão em dentífrico encontrou-se redução de 95,7% para a resina L e 83,2% para a resina T. Porém, a contagem de colônias (Tabela 2) mostrou que a imersão em dentífrico não foi eficaz, sendo necessária a ação mecânica das cerdas da escova para a remoção dos micro-organismos nos corpos de prova. Provavelmente, o dentífrico causou danos imediatos aos micro-organismos, causando redução de seu metabolismo nas 3 h de incubação do teste XTT, porém, os danos causados não foram irreversíveis, possibilitando que os micro-organismos se reproduzissem nos meios de cultura após as 48 h de incubação. Resultados de estudos anteriores<sup>25, 42, 53, 60, 81, 92</sup> afirmam que a escovação apenas com dentífrico não é um método tão eficiente. As diferenças nos valores de absorvância observadas entre as resinas podem ser explicadas pelos seus diferentes modos de polimerização, pelos diferentes monômeros que as compõe, pela porosidade de cada uma delas e por outros fatores que serão explicados no decorrer desta discussão.

O hipoclorito de sódio a 1% associado à escovação causou redução de 99,9% dos micro-organismos em L e de 99,7% em T. Na imersão, a redução foi de 99,9% para L e 99,1% para T. Estes resultados são bastante otimistas e corroboram com o estudo de Pellizzaro et al.<sup>69</sup> (2012), que encontraram redução de 100% do biofilme quando foi feita a escovação com hipoclorito de sódio a 1%, e de 88% quando foi feita a imersão neste agente de limpeza. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que verificaram que uma reduzida quantidade de células viáveis de *C. albicans* permaneceu sobre a superfície de material para base de prótese após longos períodos de imersão (10 min) em hipoclorito de sódio a 1%<sup>22, 83</sup>. Um protocolo de higienização de próteses com escovação e imersão em hipoclorito de sódio 1% reduziu o número de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* da cavidade bucal dos pacientes analisados no estudo de Barnabé et al.<sup>8</sup> (2004). Os resultados do presente estudo confirmam os resultados destes autores, pois foi demonstrada eficácia do hipoclorito de sódio na desinfecção de corpos de prova de resina acrílica contaminados com *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*. Apesar de o teste XTT ter apontado alguma atividade metabólica quando da imersão ou escovação com NaOCl, a contagem de colônias mostrou que estes micro-organismos não foram capazes de sobreviver e se reproduzirem nos meios de cultura após 48

h de incubação. Provavelmente, o NaOCl continuou agindo sobre o biofilme mesmo após o período de 3 horas de incubação do teste XTT, o que justifica a completa inativação do mesmo. O NaOCl é uma base forte (pH>11) e seu pH elevado altera a integridade da membrana citoplasmática através da degradação de fosfolipídios ou ácidos graxos insaturados ou por meio de injúrias aos componentes orgânicos e transporte de nutrientes. Esta reação causa uma inibição enzimática irreversível e alterações no metabolismo celular, resultando em morte celular<sup>35</sup>. Apesar da eficácia da imersão e da escovação com hipoclorito de sódio a 1% em inativar biofilme, este método de higienização pode apresentar algumas desvantagens, como moderado risco de citotoxicidade<sup>80</sup>, além de provocar corrosão dos componentes metálicos das próteses e alterar a cor das bases de resina acrílica<sup>7, 56</sup>. Odor e sabor desagradáveis também são relatados pelos pacientes<sup>11</sup>. Por outro lado, não foram verificadas mudanças significantes na dureza e rugosidade de resinas acrílicas quando uma concentração de 1% de hipoclorito de sódio foi utilizada durante 10 min<sup>58</sup>, bem como não houve mudanças de cor em 60 min de imersão neste mesmo agente<sup>36</sup>. Vieira et al.<sup>91</sup> (2010) verificaram que o hipoclorito de sódio foi o único tratamento que removeu o biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* sobre corpos de prova de polimetilmetacrilato de forma eficiente, uma vez que não foram encontradas células viáveis após a sua utilização. Assim, pode-se supor que o protocolo de imersão em hipoclorito de sódio a 1% durante um reduzido período de tempo (10 s), adotado neste estudo, resulta em erradicação do biofilme sem, contudo, resultar em efeitos indesejáveis nas propriedades dos materiais para base e reembasamento de próteses.

Os peróxidos alcalinos, quando dissolvidos em água, tornam-se soluções de peróxido de hidrogênio alcalino. Estes agentes promovem oxidação e também liberação de bolhas de oxigênio durante sua degradação, resultando em ação química e mecânica de limpeza da prótese. A escovação em associação com o perborato de sódio (Corega Tabs®) reduziu 99,2% do biofilme em L e 97,4% em T escovação. Já a imersão causou redução de 83% em L e 82,1% em T. Pellizzaro et al.<sup>69</sup> utilizaram um produto diferente, porém também efervescente e a base perborato de sódio, e encontraram redução de 98% com a escovação e 90% com a imersão somente. Silva et al.<sup>83</sup> (2008), após 10 minutos de imersão em Corega Tabs®, verificaram que este agente de limpeza foi o menos eficaz em comparação com hipoclorito de sódio 1%, clorexidina 2%, vinagre 100% e glutaraldeído 2%. Gornitsky et al.<sup>38</sup> (2002), utilizando pastilhas efervescentes à base de perborato de sódio (Efferdent®), de composição semelhante ao Corega Tabs®, observaram que, dentre os produtos analisados, as pastilhas Efferdent® foram as menos efetivas na redução do biofilme. Vieira et al.<sup>91</sup> (2010) verificaram que limpadores de dentaduras a base de peróxido não foram eficazes na remoção de biofilme de *Candida* spp. das superfícies de resinas para próteses dentárias e não impediram a recolonização pelo seu biofilme. Por outro lado, Kulak et al.<sup>43</sup> (1997) e Harrison et al.<sup>39</sup> (2004) relataram desempenho satisfatório de agentes de limpeza de próteses a base de perborato de sódio sobre a remoção do biofilme da superfície de próteses de resina acrílica. Os resultados destes estudos diferem dos resultados obtidos no presente estudo, possivelmente por terem sido empregadas outras condições experimentais, como um maior tempo de imersão. A contagem das colônias (Tabela 2) mostrou que a escovação com Pb foi capaz de inativar o biofilme multiespécies



em ambas as resinas, mas a imersão não foi eficaz, com valores elevados de ufc/mL de *C.albicans*, *C.glabrata* e *S. mutans* para L e T. Resultados do estudo de Abelson<sup>2</sup> (1981) indicaram que estes tabletes só removem aproximadamente 30% do biofilme acumulado em uma prótese após três dias sem higienização adequada. Para Sesma et al.<sup>82</sup> (2005), a vantagem desse produto é que ele não causa efeito deletério à resina ou ao metal da prótese, todavia, não se mostrou eficiente quando usado por menos de 30 min. Esta afirmação contrapõe-se às orientações do fabricante do Corega Tabs®, o qual recomenda que a prótese fique imersa na solução efervescente durante 5 min. De acordo com Rossato et al.<sup>77</sup> (2011), é necessário pelo menos 30 min de imersão da prótese em peróxido alcalino até que se possa provocar um efeito de limpeza comparável ao obtido com a utilização de hipoclorito de sódio.

Embora a *Candida albicans* seja o micro-organismo predominante na estomatite protética, outras espécies também podem desempenhar um papel fundamental na patogênese desta doença<sup>28</sup>. Por isso, a associação de biofilmes vem sendo bastante estudada<sup>28, 70, 71, 72</sup>. Coco et al.<sup>28</sup>, em 2008, avaliaram 37 pacientes usuários de próteses, com ou sem estomatite protética. Observaram que as leveduras orais isoladas predominantes foram *C. albicans* (75%) e *C. glabrata* (30%), que foram encontradas em proporções mais elevadas em pacientes com graus mais severos de inflamação. Estas leveduras apresentaram-se combinadas em 80% destes pacientes. Este estudo demonstrou que o biofilme misto de *C. albicans* e *C. glabrata* pode desempenhar um papel importante na patogênese associada a grave inflamação em usuários de próteses. Pereira Cenci et al.<sup>72</sup> (2008), ao estudarem a associação de biofilmes duplos formados por *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*, observaram que o *S. mutans* aumenta a formação do biofilme de *Candida*, e que a *C. albicans* possui sinergismo com *C. glabrata*. Estes resultados sugerem que não só pode haver estimulação do crescimento mútuo destes micro-organismos, mas também que eles podem agregar uns aos outros, o que pode melhorar o processo de aderência. Quanto mais complexa a composição dos biofilmes, mais resistentes parecem ser a processos de desinfecção<sup>70</sup>. As interações entre os diferentes polímeros de matriz, produzidos por diferentes micro-organismos, pode resultar em uma matriz mais viscosa e, portanto, mais resistente à desinfecção. Neste estudo foi possível observar que houve redução de 100% no número de micro-organismos após a associação da escovação com os agentes de limpeza, e até mesmo somente pela imersão em ácido peracético 0,2% e hipoclorito de sódio 1%, mostrando que, mesmo sendo o biofilme multiespécies mais resistente à desinfecção<sup>70</sup>, as terapias citadas ainda foram capazes de inviabilizá-lo.

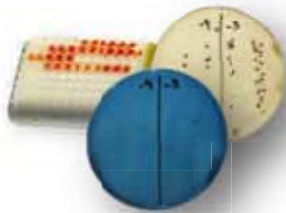
A resina para reembasamento Tokuyama Rebase Fast II (T) apresentou os maiores valores de absorvância quando comparada à resina Lucitone 550 (L) para os grupos A (E), A (I), D (I) e Pb (I), e de ufc/mL para os grupos A (E) e A (I). Sabe-se que as resinas para reembasamento imediato apresentam maior porosidade quando comparadas às resinas termopolimerizáveis convencionais, favorecendo uma maior adesão microbiana<sup>61, 87</sup>. A porosidade em resinas acrílicas tem sido definida como um fenômeno complexo que depende do tipo de material, da técnica de inclusão e método de polimerização. A ocorrência de porosidade também depende da velocidade de polimerização e da dissipação do calor durante o processo de polimerização<sup>61</sup>. A porosidade nas bases de próteses

reduz suas propriedades físicas, além de favorecer a aderência de micro-organismos, o que torna difícil removê-los por métodos de limpeza mecânica, favorecendo a deposição e aderência de cálculo e de outras substâncias<sup>61</sup>. Além disso, o método de polimerização de cada um destes materiais pode ter influenciado na retenção de micro-organismos. Por ser termopolimerizável, a reação de polimerização da resina Lucitone é ativada pelo calor, que deve ser controlado por ciclos específicos. Já a resina Tokuyama, autopolimerizável, tem sua polimerização iniciada quando a amina terciária presente no líquido entra em contato com o pó durante a manipulação. Além disso, existem relatos na literatura de que outras propriedades superficiais, como perfil e energia de superfície, tensão superficial, umidade, características hidrofóbicas, interações eletrostáticas e microdureza<sup>87, 90, 96</sup>, possam interferir diretamente na colonização de resinas acrílicas por micro-organismos. Para os demais grupos, as diferenças nos valores de absorvância e ufc/mL para as resinas L e T não foram significativas ( $p > 0,001$ ).

A estomatite protética está associada com o crescimento de *Candida* em biofilmes de próteses, e não sobre a mucosa do palato, portanto, o tratamento ideal deve ser dirigido para a prótese<sup>92</sup>. Observou-se no presente estudo que uma satisfatória higienização das próteses pode ser conseguida com a escovação, independentemente do agente de limpeza utilizado. Este achado está de acordo com o estudo de Pellizzaro et al.<sup>69</sup> (2012), que observaram que a utilização de agentes de limpeza em associação ao método de escovação provou ser efetivo para reduzir biofilme de *C. albicans* em resina acrílica. Entretanto, este método de limpeza exige boa destreza manual, o que não ocorre em alguns pacientes idosos ou com necessidades especiais. Nestas condições, seria mais indicado o método de imersão em agentes químicos. Barnabé et al.<sup>8</sup> (2004) confirmaram a necessidade da recomendação de agentes de limpeza químicos para reduzir a patogenicidade dos micro-organismos presentes na superfície de próteses, resultando em melhoria clínica das lesões por estomatite protética e no controle da *Candida* spp. e *Streptococcus* spp. Kulak et al.<sup>42</sup> (1997), Webb et al.<sup>92</sup> (1998) e Nikawa et al.<sup>60</sup> (1999) mostraram que o controle do biofilme nas próteses apenas pela escovação não é tão eficaz quanto a limpeza química na prevenção da estomatite protética associada à *Candida*. No presente estudo, o tempo de imersão de apenas 10 s nos agentes de limpeza ácido peracético 0,2% e hipoclorito de sódio a 1% foram capazes de inativar as colônias de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* para L e T, podendo, portanto, serem indicados para o controle do biofilme em próteses. Entretanto, estudos futuros necessitam ser realizados para avaliar os efeitos dos agentes de limpeza aqui testados nas propriedades dos materiais que compõe a prótese, usando o mesmo tempo deste estudo.

Chan et al.<sup>25</sup> (1991) e Sesma et al.<sup>81</sup> (1999), defenderam o tratamento combinado da escovação seguida de imersão química como o mais eficaz, visto que remove os resíduos e melhora a higienização das próteses. Neste estudo, a eficácia da remoção do biofilme foi aumentada pela escovação combinada com agentes químicos de limpeza, por outro lado, a imersão por 10 s em ácido peracético 0,2% e em hipoclorito de sódio a 1% mostraram resultados comparáveis ao da escovação. Estes resultados são bastante interessantes, pois a imersão nestes agentes de limpeza poderia ser uma alternativa viável para a desinfecção de próteses de pacientes com dificuldades motoras para

executar a escovação. Porém, estudos posteriores precisam ser realizados para comprovarem a eficácia destes tratamentos in vivo.

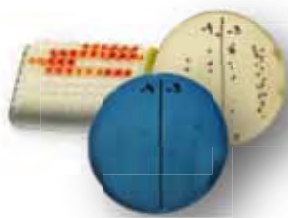


*Conclusão*

## 7 CONCLUSÃO

Com base nas condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir que:

1. A ação mecânica exercida pelo método de escovação é um fator fundamental para a redução do biofilme;
2. A imersão em hipoclorito de sódio a 1% e em ácido peracético 0,2% removeu totalmente os micro-organismos sobre as resinas, sendo tão eficiente quanto a escovação.
3. A imersão por apenas 10 segundos em digluconato de clorexidina a 1% mostrou-se eficaz na eliminação de *Candida albicans* e *Candida glabrata*.



## *Referências*

## REFERÊNCIAS\*

1. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. incidence in denture wearers. *Mycopathologia*. 2010; 169(5): 365-72
2. Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers. *J. Prosthet. Dent* 1981; 45(4): 376-79
3. Al-Bakri AG, Afifi FU. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J Microbiol Methods*. 2007; 68(1): 19–25
4. André RFG, Andrade IM, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO, Pimenta FC, Ito IY. Prevalence of Mutans Streptococci isolated from complete dentures and their susceptibility to mouthrinses. *Braz Dent J*. 2011; 22(1): 62-6
5. Asad T, Watkinson AC, Hugget R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1992; 68 (1): 191-195
6. Asad T, Watkinson AC, Hugget 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
7. Backenstose WM, Wells JG. Side effects of immersion-type cleansers on the metal components of dentures, *J Prosthet Dent*. 1977; 37(6): 615-21
8. Barnabé W, Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pregoraro 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
9. Bassiouny MA, Grant AA. The toothbrush application of chlorhexidine. A clinical trial. *Br Dent J*. 1975; 139(8): 323-7
10. Bay LM. Effect of toothbrushing with different concentrations of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis. *J Dent Res*. 1978; 57(2): 181-5
11. Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *J Prosthet Dent*. 1998; 79(4): 454-8
12. Bates JF, Smith DC. Evaluation of indirect resilient liners for denture: laboratorial and clinical tests. *J Am Dent Assoc*. 1965; 70(2): 344-53
13. Brace ML, Plummer KD. Practical denture disinfection. *J Prosthet Dent*. 1993; 70(6): 538-40
14. Brusca MI, Irastorza RM, Cattoni DI, Ozu M, Chara O. Mechanisms of interaction between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: An experimental and mathematical modelling study. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(3-4): 416-23
15. Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. 1997; 13(4): 258-69

---

\*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

16. Border BG, Rice-Spearman L. Microwaves in the laboratory: effective decontamination. *Clin Lab Sci.* 1999; 12(3): 156-60
17. Bonesvoll P. Oral pharmacology of chlorhexidine. *J Clin Periodontol.* 1977; 4(5): 49-65
18. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974; 82(2): 151-90
19. Budtz-Jorgensen, E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979; 42(6): 619-23
20. Budtz-Jorgensen E, Kelstrup J, Poulsen S. Reduction of formation of denture plaque by a protease (Alcalase®). *Acta Odontol Scand.* 1983; 41(2): 93–8
21. Budtz-Jorgensen E. Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Dis.* 1996; 2(4): 285-90
22. Buegers R, Rosentritt M, Schneider-Brachert W, Behr M, Handel G, Hahnel S. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2008; 66(3): 174-80
23. Case DE. Safety of hibitane I. Laboratory experiments. *J Clin Periodontol.* 1977; 4(5): 66-72.
24. Ceretta R, Paula MM, Angioletto E, Meier MM, Mitellstädt FG, Pich CT, Junior AS, Angioletto E. Evaluation of the effectiveness of peracetic acid in the sterilization of dental equipment. *Indian J Med Microbiol.* 2008; 26(2): 117-22
25. Chan EC, Iugovaz I, Siboo R, Bilyk M, Barolet R, Amsel R, Wooley C, Klitorinos A. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. *J Calif Dent Assoc.* 1991; 57(12): 937-9
26. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903-8
27. Chassot AL, Poisl MI, Samuel SM. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Braz Dent J.* 2006; 17(2):117-21
28. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(5): 377-83
29. Coelho CM, Sousa YT, Dare AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J. Oral Rehabil.* 2004; 31(2):135-9
30. Cruz PC, Andrade IM, Peracini A, Souza-Gugelmin MC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, et al. The effectiveness of chemical denture cleansers and ultrasonic device in biofilm removal from complete denture. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(6): 668-73
31. Dagistan S, Aktas AE, Caglayan F, Ayyildiz A, Bilge M. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, *Candida*, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. *Mycoses.* 2009; 52(3): 266-71



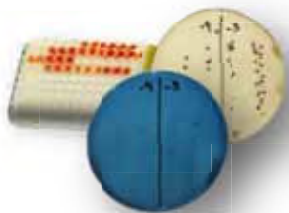
32. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008; 17(8): 627-33
33. de Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Souza-Gugelmin MC, Paranhos H de F. Effect of chlorhexidine on denture biofilm accumulation. *J Prosthodont.* 2012; 21(1): 2-6
34. Epstein J, Ransier A, Lunn R, Spinelli J. Enhancing the effect of oral hygiene with the use of a foam brush with chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 77(3): 242-7
35. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002; 13(2): 113-7
36. Fernandes FH, Orsi IA, Villabona CA. Effects of the peracetic acid and sodium hypochlorite on the colour stability and surface roughness of the denture base acrylic resins polymerised by microwave and water bath methods. *Gerodontology.* 2013; 30(1): 18-25
37. Gobor T, Corol G, Ferreira LEN, Rymovicz AUM, Rosa RT, Campelo PMS, et al. Proposal of protocols using D-glutamine to optimize the 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) assay for indirect estimation of microbial loads in biofilms of medical importance. *J Microbiol Methods.* 2011; 84(2): 299–306
38. Gornitsky M, Paradisi I, Landaverde G, Malo AM, Velly AM. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. *J Can Dent Assoc.* 2002, 68(1): 39-45
39. Harrison Z, Johnson A, Douglas CW. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(5): 460–7
40. Koban I, Matthes R, Hübner N, Welk A, Sietmann R, Lademann J, et al. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2012; 7(1): Doc06
41. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherje PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 506–8
42. Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(10): 788-90
43. Kulak Y, Arikan A, Albak S, Okar I, Kazazoglu E. Scanning electron microscopic examination of different cleaners: surface contaminant removal from dentures. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(3): 209-15
44. Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing-the best approach. *Br Dent J.* 1995; 178(11): 413-7
45. Langwell WH. The cleansing of artificial dentures. *Br Dent J.* 1955; 15(11): 337-9
46. Lensing HH, Oei HL. Investigations on the sporicidal and fungicidal activity of disinfectants. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B.* 1985; 181(6): 487–95
47. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res.* 2007; 86(3): 204–15

48. Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1999; 81(2): 202-6
49. Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J.* 2009; 42(4): 335-43
50. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS.* 2002; 110(9): 601-10
51. Marchini L, Tamashiro E, Nascimento DF, Cunha VP. Self-reported denture hygiene of a sample of edentulous attendees at a University dental clinic and the relationship to the condition of the oral tissues. *Gerodontology.* 2004; 21(4): 226-8
52. MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(10): 753-60
53. MacNeill S, Walters DM, Dey A, Glaros AG, Cobb CM. Sonic and mechanical toothbrushes. An in vitro study showing altered microbial surface structures but lack of effect on viability. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(12): 988-93
54. Marabini L, Frigerio S, Chiesara E, Radice S. Toxicity evaluation of surface water treated with different disinfectants in HepG2 cells. *Water Res.* 2006; 40(1-2): 267-72
55. 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): e 65-71
56. Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfectants in infection control. *Dent Clin North Am.* 1991; 35(2): 323-71
57. Montagner H, Montagner F, Braun KO, Peres PE, Gomes BP. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(5): 432-5
58. 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
59. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Sadamori S, Agrawal S. Cleansing efficacy of commercial denture cleansers: ability to reduce *Candida albicans* biofilm activity. *Int J Prosthodont.* 1995; 8(6): 527-34
60. 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
61. Novais PM, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Jorge JH. The occurrence of porosity in reline acrylic resins. Effect of microwave disinfection. *Gerodontology.* 2009; 26(1): 65-71
62. Odman PA. The effectiveness of an enzyme-containing denture cleanser. *Quintessence Int* 1992; 23(3): 187-90

63. O'Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology*. 2000; 146 (Pt 1): 41-8
64. Paranhos HFO, Malachias A, Pardini LC. Materiais para limpeza de dentaduras: revisão da literatura. *Rev Fac Odontol Lins*. 1991; 4(2): 15-8
65. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM et al. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil*. 2007; 34(8): 606-12
66. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, et al. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont*. 2009; 18(5): 427-31
67. Paraskevas S, Rosema NA, Versteeg P, Timmerman MF, van der Velden U et al. The additional effect of a dentifrice on the instant efficacy of toothbrushing: a crossover study. *J Periodontol*. 2007; 78(6): 1011-6
68. Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL, Giampaolo ET, Teraoka MT. The effect of disinfectant solutions on the hardness of acrylic resin denture teeth. *J Oral Rehabil*. 2003; 30(7): 749-52
69. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida Albicans* biofilm viability. *Braz Dent J*. 2012; 23(5): 547-54
70. Pereira CA, Romero RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: na in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2011; 26(3): 341-8
71. Pereira-Cenci T, Del BelCury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new Insights. *J Appl Oral Sci*. 2008; 16(2): 86-94
72. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(8):755-64
73. Pinto L de R, Acosta EJ, Távora FF, da Silva PM, Porto VC. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard relines acrylic resins. *Gerodontology*. 2010; 27(2): 147-53
74. Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(9): 3515-9
75. Ribeiro, RC. Efeito do tempo e da desinfecção por micro-ondas no desempenho clínico e na quantificação de micro-organismos de um reembasador rígido [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009
76. Robinson JG, McCabe JF, Storer R. The whitening of acrylic dentures: the role of denture cleaners. *Br Dent J*. 1985; 159(8): 247-50
77. Rossato MB, Unfer B, May LG, Braun KO. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. *Oral Health Prev Dent*. 2011; 9(3): 221-7

78. Rutala WA. Clinical effectiveness of low-temperature sterilization technologies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998; 19(10): 798-804
79. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(2): 398-429
80. Sagripanti JL, Bonifacino A. Cytotoxicity of liquid disinfectants. *Surg Infect.* 2000; 1(1): 3-14
81. Sesma N, Takada KS, Laganá DC, Jaeger RG. Eficiência de métodos caseiros de higienização e limpeza de próteses parciais removíveis. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1999; 53(6): 463-8
82. Sesma N, Lagana DC, Gil C, Morimoto S. Capacidade de remoção do biofilme por meio de um produto enzimático para higienização de bases protéticas. *RPG.* 2005; 12(4): 417-22
83. Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito 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
84. Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly (methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 94(1): 149-56
85. Souza FA, Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. *Braz Oral Res.* 2009; 23(4): 381-5.
86. Stern MA, Whitacre RJ. Avoiding cross-contamination in prosthodontics. *J Prosthet Dent.* 1981; 46(2): 120-2
87. Taylor R, Maryan C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *J Prosthet Dent.* 1998; 80(5): 592-7
88. Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses.* 2009; 52(6): 467-75
89. Uludamar A, Özyesil GA, Ozkan YK. Clinical and microbiological efficacy of three different treatment methods in the management of denture stomatitis. *Gerodontology.* 2010; 28(2): 104-10
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. Vieira AP, Senna PM, Silva WJ, Del Bel Cury AA. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida* spp. biofilm recolonization on liner surface. *Braz Oral Res.* 2010; 24(3): 342-8
92. Webb BC, Thomas CJ, Harty DWS, Wiicox MDP. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil.* 1998; 25(6): 416-23
93. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology.* 2005; 22(3): 168-76
94. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(6): 1704–13

95. Wilson J. The etiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J.*1998; 185(8):380-84
96. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13(2): 136-40



*Apêndice*

## APÊNDICE

Tabela A1- Valores originais das médias e desvios-padrão (DP) das triplicatas de absorvância pelo ensaio de XTT nos materiais Lucitone e Tokuyama.

Material	Agente	Escovação Média (DP)	Imersão Média (DP)
Lucitone	C	0,076 (0,049)	1,395 (0,210)
	Ac	0,000 (0,000)	0,004 (0,006)
	Chx	0,009 (0,007)	0,004 (0,004)
	D	0,067 (0,018)	0,083 (0,024)
	NaOCl	0,002 (0,004)	0,002 (0,003)
	Pb	0,014 (0,012)	0,326 (0,153)
	C+	1,908 (0,207)	
Tokuyama	C	0,123 (0,080)	1,468 (0,219)
	Ac	0,004 (0,005)	0,004 (0,004)
	Chx	0,005 (0,003)	0,006 (0,008)
	D	0,136 (0,034)	0,322 (0,163)
	NaOCl	0,007 (0,007)	0,017 (0,013)
	Pb	0,050 (0,019)	0,343 (0,157)
	C+	1,854 (0,223)	

Tabela A2- Valores originais (ufc/mL) das médias e logaritmo das triplicatas de *Candida albicans* para a resina Lucitone.

Tratamento	Agente	Contagem	UFC	Log(UFC)
Escovação	A	0	0	0,000
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	0	0	0,000
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	0	0	0,000
	Imersão	A	7	1100000
Ac		0	0	0,000
Chx		0	0	0,000
D		3	133000	5,038
NaOCl		0	0	0,000
Pb		4	400000	5,537
C+		13	1290000	6,042

Tabela A3- Valores originais (ufc/mL) das médias e logaritmo das triplicatas de *Candida albicans* para a resina Tokuyama.

Tratamento	Agente	Contagem	UFC	Log(UFC)
<b>Escovação</b>	A	0	0	0,000
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	0	0	0,000
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	0	0	0,000
<b>Imersão</b>	A	18	1780000	6,153
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	2	238000	5,299
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	10	1030000	5,953
	C+	36	3670000	6,532

Tabela A4- Valores originais (ufc/mL) das médias e logaritmo das triplicatas de *Candida glabrata* para a resina Lucitone.

Tratamento	Agente	Contagem	UFC	Log(UFC)
<b>Escovação</b>	A	0	0	0,000
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	0	0	0,000
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	0	0	0,000
<b>Imersão</b>	A	67	8990000	6,891
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	3	567000	5,415
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	4	761000	5,599
	C+	31	5180000	6,559

Tabela A5- Valores originais (ufc/mL) das médias e logaritmo das triplicatas de *Candida glabrata* para a resina Tokuyama.

Tratamento	Agente	Contagem	UFC	Log(UFC)
<b>Escovação</b>	A	0	0	0,000
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	0	0	0,000
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	0	0	0,000
<b>Imersão</b>	A	20	1960000	6,250
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	22	2200000	6,324
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	23	2540000	6,363
	C+	25	2360000	6,343



Tabela A6- Valores originais (ufc/mL) das médias e logaritmo das triplicatas de *Streptococcus mutans* para a resina Lucitone.

Tratamento	Agente	Contagem	UFC	Log(UFC)
<b>Escovação</b>	A	5	23900000	6,924
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	0	0	0,000
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	0	0	0,000
<b>Imersão</b>	A	14	57900000	7,319
	Ac	0	0	0,000
	Chx	4	11100000	6,496
	D	7	31300000	6,916
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	6	30400000	6,971
	C+	29	146000000	7,702

Tabela A7- Valores originais (ufc/mL) das médias e logaritmo das triplicatas de *Streptococcus mutans* para a resina Tokuyama.

Tratamento	Agente	Contagem	UFC	Log(UFC)
<b>Escovação</b>	A	2	11100000	6,396
	Ac	0	0	0,000
	Chx	0	0	0,000
	D	0	0	0,000
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	0	0	0,000
<b>Imersão</b>	A	7	34900000	7,048
	Ac	0	0	0,000
	Chx	8	43400000	7,128
	D	10	52700000	7,247
	NaOCl	0	0	0,000
	Pb	8	40400000	7,031
	C+	10	61400000	7,054

Tabela A8- Sumário da análise de variância para a avaliação de absorvância através do teste de XTT para a resina Lucitone.

	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Lucitone	3	9,018	324,94	0,000
Resíduo	44	0,028		

Tabela A9- Análise de variância para a avaliação de absorvância através do teste de XTT para a resina Tokuyama.

	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Tokuyama	5	6,822	260,86	0,000
Resíduo	66	0,026		

Tabela A10- Análise de variância para a avaliação de logaritmo de contagem de *Candida albicans* para a resina Lucitone.

	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Lucitone ( <i>C. albicans</i> )	3	2,459	30,87	0,000
Resíduo	44	0,080		

Tabela A11- Análise de variância para a avaliação de logaritmo de contagem de *Candida albicans* para a resina Tokuyama.

	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Tokuyama ( <i>C. albicans</i> )	3	3,195	35,10	0,000
Resíduo	44	0,091		

Tabela A12- Análise de variância para a avaliação de logaritmo de contagem de *Candida glabrata* para a resina Lucitone.

	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Lucitone ( <i>C. glabrata</i> )	3	6,223	25,13	0,000
Resíduo	44	0,248		

Tabela A13- Análise de variância para a avaliação de logaritmo de contagem de *Candida glabrata* para a resina Tokuyama.

	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Tokuyama ( <i>C. glabrata</i> )	3	0,029	0,91	0,443
Resíduo	44	0,032		

Tabela A14- Análise de variância para a avaliação de logaritmo de contagem de *Streptococcus mutans* para a resina Lucitone.

	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Lucitone ( <i>S. mutans</i> )	5	2,027	2,27	0,058
Resíduo	66	0,894		

Tabela A15- Análise de variância para a avaliação de logaritmo de contagem de *Streptococcus mutans* para a resina Tokuyama.

	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Tokuyama ( <i>S. mutans</i> )	5	1,072	1,18	0,327
Resíduo	66	0,906		

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)  
Araraquara, 20 de março de 2013.  
BEATRIZ HELENA DIAS PANARIELLO