



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



Camilla Olga Tasso

**Efetividade clínica de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme
presente em próteses totais removíveis**

Araraquara

2019



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



Camilla Olga Tasso

**Efetividade clínica de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme
presente em próteses totais removíveis**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Odontologia,
Araraquara, para a obtenção do título
de Mestre em Reabilitação Oral, Área
de concentração em Prótese.

**Orientadora: Profa. Dra. Janaina
Habib Jorge**

Araraquara

2019

Tasso, Camilla Olga

Efetividade clínica de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme presente em próteses totais removíveis / Camilla Olga Tasso. --

Araraquara: [s.n.], 2019

91 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

1. Biofilmes 2. Estomatite sob prótese 3. Desinfecção 4. Estudo clínico
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Camilla Olga Tasso

**Efetividade clínica de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme
presente em próteses totais removíveis**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Carolina Pero Vizoto

3º Examinador: Profa. Dra. Dalva Cruz Laganá

Araraquara, 01 de março de 2019.

DADOS CURRICULARES

Camilla Olga Tasso

NASCIMENTO:	06/02/1991 – São Carlos – SP
FILIAÇÃO:	Luis Carlos Tasso Luzia Pereira Candido Tasso
2011 a 2016	Graduação em Odontologia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
2012 a 2013	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Dentística, do Departamento de Odontologia Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2013 a 2014	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Periodontia, do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014 a 2015	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Removível, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2015 a 2016	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Removível, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2017 a 2019	Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2017 a 2018	Estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho à Deus por seu olhar generoso sobre a minha vida, sempre me guardando, me guiando e amparando em todos os meus momentos, sejam eles de aflições ou alegrias.

Agradeço por todas as pessoas queridas que me acompanham nesse caminho, segurando em minha mão, e que de alguma forma tornaram possível a realização deste sonho. Principalmente aos meus pais Luis e Luzia, pelo apoio imensurável, confiança e amor que depositam em mim; vocês são minha motivação de vida, e força para lutar pelos meus objetivos, são a verdadeira fonte do meu amor eterno.

Ao meu irmão Pedro, que está ao meu lado por toda a minha vida, alegria dos meus dias, mesmo sendo o mais novo, me ajuda a encontrar quase todas as respostas e caminhos. Ao meu namorado Gabriel por ser tão cuidadoso, amoroso, por toda a paciência em me ajudar a ser uma pessoa melhor; você é um exemplo de amor e dedicação por onde passa, você é luz na minha vida!

Amo muito cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom de minha vida, pelas inúmeras vezes que me amparou, me iluminou e me fez encontrar meu verdadeiro caminho quando parecia que não havia luz. Minha vida é, e sempre será dedicada ao Senhor.

Aos meus pais Luis e Luzia por serem pessoas incríveis, bondosas, generosas, e que apesar de todas as dificuldades sempre lutaram pelo nosso futuro, e por nos dar ótimos exemplos, tanto pessoais como profissionais; tudo que eu faço dedico a vocês.

Ao meu irmão Pedro por ter se tornado uma pessoa tão admirável, dedicado e amoroso. Você é brilhante e eu morro de orgulho de ser sua irmã, que sua inteligência e carisma te faça conquistar o mundo.

Ao meu namorado Gabriel por todos esses anos ao meu lado, sempre me apoiando, me ajudando, e preenchendo os meus dias de amor e carinho. Minha vida sem você com certeza seria vazia.

Aos meus sogrinhos Izabel e Celso, que me adotaram como uma filha, e estão sempre cuidando e me amparando por todos esses anos. Vocês são pessoas incríveis!

Aos meus familiares que são tão presentes, que vibram a cada conquista, que param o mundo para lutarem por mim; meus sinceros agradecimentos por vocês significarem tanto. Agradeço a todos que já são estrelinhas no céu, pois sempre me amaram incondicionalmente, e torceram tanto por minhas conquistas!

Agradeço principalmente à minha querida orientadora, Janaina Habib Jorge, por simplesmente ter se tornado mais que uma professora em minha vida, por ser toda a força, exemplo de garra e dedicação com todos os seus alunos, uma pessoa bondosa, amiga, de alto astral. Você tem um brilho especial, e sua alegria sempre me contagia. Obrigada por ter acreditado em meu potencial desde a minha iniciação científica, e por sempre estar presente e disposta a me ajudar em todos os momentos. Espero que nossa parceria e amizade perdure por muitos anos. Obrigada por todo o aprendizado!

Agradeço as minhas amigas de infância, Renata, Érica, Marcela, Sthefany e Taína que estão em meu coração por toda a minha vida, fazendo dos meus dias mais leves. Amo vocês!

Agradeço a todas as minhas queridas “migas” que a graduação me deu, Alice, Giovanna, Jaqueline, minha eterna duplinha Débora, foram tantos momentos e histórias que vivemos juntas, tenho certeza que nossa amizade vai muito além da faculdade. Obrigada por tudo meninas!

Não posso deixar de agradecer as pessoas maravilhosas que a pós-graduação me presenteou, Claudia, Jacqueline, Maria Isabel e a Isadora; muito obrigada por todo apoio, ensinamentos, ajuda em todos os momentos de leve desespero que a gente sabe que eu sempre tenho! Claudia você se tornou uma amiga irmã e tenho certeza que seu futuro é brilhante por toda a dedicação que você tem de ir além! Jacqueline, minha querida amiga e companheira de orientadora, que é muito mais que uma simples amiga e confidente, obrigada por todos os momentos que vivemos juntas até aqui. Bel, miga muito obrigada por ter respondido todas as minhas mensagens de socorro! Muitas das coisas que aprendi nessa vida de pesquisa, foi graças a sua paciência e maestria de ensinar, com toda certeza você está no caminho certo. Isa, obrigada por ter se tornado essa amiga tão presente, e tão parecida comigo, por sempre estar disposta a fazer nossas pesquisas e projetos, inclusive em feriados e finais de semanas, não precisaria nem falar, mas você tem um perfeccionismo admirável em tudo que realiza. Amo vocês meninas!!!

Aos meus amigos e companheiros da turma de Mestrado, Bruna, Carlos, Diego, Monica, Marcela, Thais, Claudia, Sabrina, Fernanda, Lais, Mariana, e Camila, por todo esse tempo de convívio na sala de aula, nas clínicas e nos labs da vida, nossa turma sempre foi muito unida, e espero que continuemos juntos por muitos anos!

A minha amiga Analú, minha querida best, por estar sempre comigo, em todos os momentos da minha vida, por me amar, e sempre ajudar. Obrigada por ser minha amiga mais ciumenta, por ser tão parecida comigo e sempre pegar meus sotaques, você é uma parte essencial no meu mundo.

Ao meu amigo e professor Túlio (Tulião), por sempre esclarecer minhas dúvidas, por ter realizado minha estatística, e por nunca negar seu conhecimento. Todos os alunos que tiverem a honra de ter aula com você terão muita sorte. Você realmente ama o que faz!

Agradeço aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese desta Faculdade, pelo amor a profissão, por serem mais que professores, por todos os ensinamentos e serem pessoas admiráveis.

Aos Funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese desta Faculdade, em especial à chiquetosa Miriam, Martinha e Tânia, por fazerem de nosso departamento um lugar melhor, por toda a disposição por me ajudarem, obrigada Tânia por sempre me dar os recados dos pacientes da pesquisa, e me ajudar a conseguir voluntários!

Agradeço a todos os funcionários desta Faculdade, as meninas da limpeza, secretárias, porteiros, seguranças, que se esforçam ao máximo para fazer desse lugar, um ambiente tão agradável. Agradeço as funcionárias da biblioteca, por todo carinho e paciência que realizam seu trabalho. Ao saudoso Afonso, que sempre nos ajudava com a quantidade de xerox e matérias que íamos buscar com ele. Meu eterno agradecimento!

Agradeço aos amigos de Laboratório, Paula, Geisiane, Bruna e Lígia, muito obrigada por toda ajuda, e troca de conhecimentos!

Aos Professores Membros da Banca Examinadora, por terem aceitado tão prontamente meu convite para participar da avaliação deste trabalho. A querida Profa. Dra. Ana Carolina Pero Vizoto, por estar me acompanhando desde minha pré-qualificação, sempre tão correta e amorosa com suas sugestões. A Profa. Dra. Dalva Cruz Laganá, que aceitou vir de São Paulo para participar dessa banca, se mostrando de maneira tão atenciosa.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Agradeço pela doação de escovas à Curaprox, que deixaram a pesquisa mais completa, e com menos vieses. Meu muito obrigada!!

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP e a Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, diretora desta Instituição.

A todos os meus queridos pacientes que participaram deste estudo, de forma tão dedicada e carinhosa.

“Todo mundo tem dentro de si um fragmento de boas notícias. A boa notícia é que você não sabe quão extraordinário você pode ser! O quanto você pode amar! O que você pode executar! E qual é o seu potencial. Anne Frank *

* Anne Frank. Diário de Anne Frank. Países Baixos; 1947

Tasso CO. Efetividade clínica de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme presente em próteses totais removíveis [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019

RESUMO

As dificuldades de higienização e controle do biofilme das próteses podem resultar em desequilíbrio da microbiota e desencadear a proliferação dos micro-organismos, inclusive patogênicos. A adoção de métodos que inativem os micro-organismos da superfície da prótese é imprescindível para prevenção e tratamento de infecções. O objetivo deste estudo clínico, randomizado do tipo cross-over foi avaliar a efetividade de sabonetes líquidos desinfetantes na inativação de micro-organismos presentes em próteses totais removíveis. Vinte e oito participantes totalmente desdentados superiores foram selecionados para o estudo de acordo com a sequência estabelecida para utilização dos métodos de higienização: HS: hipoclorito de sódio 0,5% (grupo controle positivo); SD: sabonete líquido Dettol; SL: sabonete líquido Lifebuoy; PBS: solução de PBS (grupo controle negativo). O tratamento consistiu na imersão das próteses totais superiores dos participantes nas soluções por 8 horas (overnight), durante sete dias. Neste estudo clínico randomizado adotou-se delineamento cruzado (crossover), onde todos os tratamentos (métodos de desinfecção) foram aplicados a todos os participantes, eliminando, assim, a possibilidade de variação entre os indivíduos em resposta a estes tratamentos. Amostras do biofilme das próteses foram obtidas antes (baseline) e após cada tratamento, utilizando-se swab estéril, e o material microbiológico foi diluído e plaqueado em meios seletivos para *Candida spp.* O sabonete líquido desinfetante foi considerado efetivo quando houve a redução de pelo menos 3 logs dos micro-organismos presentes nas próteses em relação ao baseline. A porcentagem de redução foi calculada pela subtração dos valores totais de UFC/mL (para cada micro-organismo) obtidos em cada tempo de avaliação em relação ao tempo zero (primeira coleta). O cálculo foi realizado para cada grupo experimental. Para a análise de variância o teste estatístico utilizado foi o ANOVA one way com correção de Welch, o pós teste de Games- Howell com nível de significância de 0,05. No presente estudo foram incluídos pacientes portadores de prótese total superior com mucosa oral e condições sistêmicas saudáveis. Foi constatada a maior incidência de *C. albicans*, apresentando frequência entre 66 e 88% nas intervenções analisadas, seguida de *C. tropicalis*, com uma frequência entre 7 e 33%. No presente estudo, hipoclorito de sódio a 0,5% foi capaz de reduzir mais de 3 logs de micro-organismos para todos os pacientes, mostrando sua alta efetividade antifúngica, tanto para espécies de *Candida albicans*, como para *Candida tropicalis*. Já o grupo PBS (controle negativo), não teve diferença significativa após as intervenções. Em relação aos grupos experimentais, ambos os sabonetes líquidos (Dettol e Lifebuoy) foram eficazes na redução dos dois tipos de micro-organismos isolados da base interna das próteses totais dos voluntários. No caso da *C. albicans*, as soluções tiveram a capacidade de zerar a contagem de micro-organismos ou reduzir em 3 logs de UFC/mL. Os resultados do pós-teste de Games- Howell quando os grupos foram cruzados entre si, foi possível observar que quando comparado o Grupo HS com os demais grupos de intervenções houve uma diferença significativa ($p < 0,05$). Já para os grupos SD e SL não foi observada diferença estatisticamente significativa entre eles. O grupo PBS apresentou diferença estatística para os demais grupos. Foi observada redução estatisticamente significante nos grupos HS ($p < 0,001$), SD ($p < 0,001$), SL

($p < 0,001$), e PBS ($p = 0,643$). Para *Candida tropicalis*, o resultado do pós-teste de Tukey quando os grupos foram cruzados entre si, pode-se observar que os valores do grupo HS e do grupo PBS, tem uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), também é possível observar uma diferença significativa entre o grupo controle PBS e os grupos de sabonete SD e SL. Quando comparamos os grupos HS, SD e SL não foi observado diferença significativa, comprovando assim que os três são igualmente eficazes no controle de *Candida tropicalis*. Até o momento, os resultados desse estudo mostram que os sabonetes líquidos poderiam ser uma alternativa para desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais, levando em consideração sua efetividade na redução do biofilme (estudos in vivo e in vitro) e sua não citotoxicidade (estudos in vitro).

Palavras-chave: Biofilmes. Estomatite sob prótese. Desinfecção. Estudo clínico.

Tasso CO. Clinical efficacy of disinfectant liquid soaps in the control of biofilm present in total removable dentures [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019

ABSTRACT

The difficulties related to hygiene and biofilm control on buccal prosthesis may unbalance the microbiota and trigger the proliferation of microorganisms, including pathogens. Adopting methods that inactivate microorganisms at the surface of the prosthesis is essential for preventing and treating infections. The difficulties of sanitizing and controlling the biofilm of the prostheses can result in imbalance of the microbiota and trigger the proliferation of microorganisms, including pathogens. The adoption of methods that inactivate microorganisms on the surface of the prosthesis is essential for the prevention and treatment of infections. The objective of this cross-over randomized clinical trial was to evaluate the effectiveness of liquid disinfectant soaps in the inactivation of microorganisms present in total removable dentures. Twenty-eight upper fully edentulous participants were selected for the study according to the established sequence for use of the hygiene methods: HS: sodium hypochlorite 0.5% (positive control group); SD: Dettol liquid soap; SL: Lifebuoy liquid soap; PBS: PBS solution (negative control group). The treatment consisted in immersing the upper limbs of the participants in the solutions for 8 hours (overnight) for seven days. In this randomized crossover study, all treatments (disinfection methods) were applied to all participants, thus eliminating the possibility of variation among individuals in response to these treatments. Biofilm samples of the prostheses were obtained before (baseline) and after each treatment using sterile swab, and the microbiological material was diluted and plated in selective media for *Candida* spp. The disinfectant liquid soap was considered effective when there was a reduction of at least 3 logs of the microorganisms present in the prostheses in relation to the baseline. The percent reduction was calculated by subtracting the total values of CFU / mL (for each microorganism) obtained at each evaluation time in relation to time zero (first collection). The calculation was performed for each experimental group. For the analysis of variance the statistical test used was the ANOVA one way with Welch correction, Games-Howell post-test with a significance level of 0.05. In the present study, patients with upper total prosthesis with oral mucosa and healthy systemic conditions were included. The highest incidence of *C. albicans* was observed, presenting a frequency between 66 and 88% in the analyzed interventions, followed by *C. tropicalis*, with a frequency between 7 and 33%. In the present study, 0.5% sodium hypochlorite was able to reduce more than 3 logs of microorganisms for all patients, showing its high antifungal effectiveness for both *Candida albicans* and *Candida tropicalis* species. However, the PBS group (negative control) had no significant difference after the interventions. Regarding the experimental groups, both liquid soaps (Dettol and Lifebuoy) were effective in reducing the two types of microorganisms isolated from the internal base of the volunteers' total dentures. In the case of *C. albicans*, the solutions had the capacity to zero the microorganism count or reduce in 3 CFU / mL logs. The results of the Games-Howell post-test when the groups were crossed between them, it was possible to observe that when the HS Group compared with the other groups of interventions there was a significant difference

($p < 0.05$). For the SD and SL groups, no statistically significant difference was observed between them. The PBS group presented statistical difference for the other groups. A statistically significant reduction was observed in the HS ($p < 0.001$), SD ($p < 0.001$), SL ($p < 0.001$), and PBS ($p = 0.643$) groups. For *Candida tropicalis*, the Tukey post-test result when the groups were crossed with each other, it can be observed that the values of the HS group and the PBS group have a statistically significant difference ($p < 0.05$), it is also possible to observe a significant difference between the PBS control group and the SD and SL soap groups. When comparing the HS, SD and SL groups, no significant difference was observed, thus proving that all three are equally effective in controlling *Candida tropicalis*. To date, the results of this study show that liquid soaps could be an alternative for disinfection of partial or total removable dentures, taking into account their effectiveness in reducing biofilm (in vivo and in vitro studies) and their non-cytotoxicity (in vitro studies).

Keywords: Biofilms. Stomatitis, denture. Disinfection. Clinical study.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 <i>Candida</i> spp.....	23
3.2 Biofilme.....	26
3.3 Agentes Desinfetantes.....	30
4 MATERIAL E MÉTODO	38
4.1 Delineamento de Estudo	38
4.2 Seleção da Amostra	39
4.3 Critérios de Inclusão.....	39
4.4 Critérios de Exclusão.....	40
4.5 Grupos Experimentais e Métodos de Desinfecção.....	43
4.6 Coleta de Biofilme da Prótese Total.....	45
4.7 Distribuição do Material.....	46
4.8 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	48
4.9 Análise Estatística.....	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Dados Demográficos e Distribuição dos Voluntários nos Diferentes Grupos.....	50
5.2 Identificação das Espécies de <i>Candida</i>	53
5.3 Identificação das Espécies de <i>Candida</i> da Parte Interna das Próteses Totais.....	53
5.4 Avaliação do Efeito das Soluções Desinfetantes Sobre o Crescimento de <i>Candida albicans</i>	54
5.5 Avaliação do Efeito das Soluções Desinfetantes Sobre o Crescimento de <i>Candida tropicalis</i>	58
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	70

REFERÊNCIAS	71
--------------------------	-----------

ANEXO A – Registro do estudo na base de Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos	82
--	-----------

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Instituição	87
--	-----------

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	90
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de *Candida* são encontradas na mucosa oral em relação de comensalismo¹. Estes micro-organismos são usualmente inofensivos, porém a alteração da morfologia de leveduras (blastoporo), presente na mucosa bucal normal, para o tipo micelial (pseudohifas) é responsável pelo desenvolvimento de infecções². Além desse fungo, algumas espécies bacterianas associadas a doenças sistêmicas têm sido encontradas em próteses removíveis, como bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp.) e Gram-negativas (*Neisseria* perfava, *Pseudomonas* aeruginosa e *Klebsiella pneumoniae*³⁻⁵.

Em geral, as infecções por *Candida* começam com a adesão e colonização de células de levedura em uma superfície, embebida por uma matriz polimérica⁶⁻⁸. Sendo assim, os biofilmes são comunidades heterogêneas de micro-organismos presos em uma matriz extracelular que limita a penetração de drogas antimicrobianas e anticorpos⁹. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção para seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas, e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis. Para os fungos, a formação de biofilmes fornece à comunidade microbiana proteção e resistência às drogas¹⁰. A habilidade de formar biofilmes está intimamente associada à capacidade de causar infecções e pode ser considerada um importante fator de virulência¹¹.

A candidose é a infecção mais comum da cavidade bucal, e a estomatite protética é a sua manifestação mais prevalente, acometendo 60% dos pacientes usuários de próteses¹². *Candida albicans* é a espécie de *Candida* mais associada às infecções sistêmicas em todo o mundo¹³. Seu principal fator de virulência é a capacidade de formar biofilmes¹⁴. A formação de biofilmes é um fator de virulência crucial, que permite aumentar sua resistência de 30-2000 a vários agentes antifúngicos¹⁵. Os biofilmes de *C. albicans* são muito difíceis de tratar e são necessárias altas concentrações de drogas antifúngicas para reduzir a sua formação.

Na maioria dos casos para se obter resultados satisfatórios, são necessárias concentrações de 5 a 8 vezes maiores que a concentração inibitória mínima (CIM) usada em células planctônicas¹⁶. Um estudo anterior usando microscopia eletrônica de varredura, mostrou que uma concentração de 11 vezes a da CIM para a anfotericina B não conseguiu interromper o biofilme de *C. albicans*¹⁶. A patogênese da estomatite protética está fortemente associada ao crescimento excessivo de

Candida spp na superfície interna da prótese, consistindo principalmente em *C. albicans*, além de outros fatores locais, como próteses e higiene inadequadas. Os aspectos inerentes ao hospedeiro também estão fortemente associados à etiologia, como deficiências nutricionais, diabetes mellitus, uso de drogas imunossupressoras e envelhecimento, uma vez que esses fatores contribuem para uma resposta imune deficiente e, portanto, para o estabelecimento e manutenção da estomatite protética^{12,17}. O sistema imunológico do hospedeiro é o principal fator que equilibra a transição do comensalismo para a patogenicidade. Quando as defesas imunológicas são comprometidas, ou o equilíbrio normal da microflora é interrompido, *Candida* spp são transformadas em oportunistas que podem invadir os tecidos¹⁸.

A interface entre a prótese e a mucosa oferece um nicho ecológico único para a colonização de micro-organismos devido ao ambiente relativamente anaeróbico e ácido. A alta taxa de recorrência da doença sublinha a importância da prevenção da contaminação e higienização das próteses^{12,19}. Assim, é necessário um controle efetivo do biofilme com uma higienização adequada da prótese, pois a aderência de micro-organismos e resíduos é favorecida por superfícies irregulares e rugosas²⁰. A higienização pode ser realizada mecanicamente, quimicamente ou pela combinação de ambas²¹⁻²². O procedimento mecânico de remoção do biofilme nas superfícies das próteses mais utilizado pelos pacientes é a escovação com sabão ou dentífrico²³.

Para a higienização correta das próteses, certo grau de destreza manual é requerido, o que quase sempre é perdido em pacientes idosos²⁴. Dessa forma, a limpeza química, como a imersão das próteses em soluções desinfetantes, deveria também ser realizada para aumentar a efetividade da higienização. Estratégias de desinfecção por soluções químicas têm sido frequentemente recomendadas devido a sua efetividade em inibir ou eliminar diferentes micro-organismos²⁵. Vários são os agentes químicos de limpeza utilizados para a desinfecção ou redução do biofilme das próteses, como hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina e álcool²⁰⁻²¹. O hipoclorito de sódio pode ser útil para a desinfecção das próteses, uma vez que inativa o biofilme bacteriano e inibe a formação de cálculo²⁶⁻²⁷. Já o gluconato de clorexidina, além de inativar o biofilme, reduz a capacidade de adesão dos micro-organismos, sendo considerado efetivo na desinfecção de próteses²⁸⁻²⁹. Porém, estudos mostram algumas desvantagens em relação à utilização desses agentes desinfetantes.

O glutaraldeído, apesar de possuir ação bactericida, não deve ser utilizado para a imersão de próteses, uma vez que pode ficar impregnado nas porosidades das

resinas, resultando em efeito irritante aos tecidos bucais²¹. O hipoclorito de sódio em concentrações maiores que 1% pode causar efeitos citotóxicos moderados aos tecidos bucais, além de promover branqueamento das bases acrílicas e corrosão dos componentes metálicos das próteses³⁰⁻³¹. Outras desvantagens associadas à desinfecção por agentes químicos são redução da resistência à flexão após a imersão em álcool, baixa efetividade antimicrobiana dos iodóforos e manchamento das bases das próteses pelo uso de soluções à base de clorexidina³²⁻³³. Além disso, um estudo recente demonstrou que algumas soluções desinfetantes podem aumentar a toxicidade da resina de base após longos períodos de imersão³⁴. Embora existam vários agentes químicos disponíveis no mercado, nenhum deles possui propriedades ideais.

Em função das desvantagens descritas na literatura do uso de agentes químicos na desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais, novos produtos deveriam ser avaliados. Atualmente, os sabonetes antissépticos têm sido muito utilizados com o objetivo de eliminar os micro-organismos de várias superfícies. A eficácia como agente antimicrobiano tem sido constantemente comprovada. Os sabonetes antissépticos são capazes de remover de 65% a 85% dos micro-organismos existentes na pele humana³⁵⁻³⁶.

Os sabões são sais de sódio de ácidos carboxílicos de cadeia longa, e esta estrutura molecular quando em contato com líquidos, dissolve-se interagindo com suas moléculas. A forma líquida vem sendo amplamente utilizada, e sua produção pode ser classificada entre sintéticos e naturais, com suas vantagens e desvantagens³⁷. Os sabonetes líquidos desinfetantes vêm sendo utilizados amplamente em função das suas características antimicrobianas, porém estudos sobre suas possíveis aplicações são muito escassos. Um estudo relatou o uso dos sabonetes desinfetantes para desinfecção de sondas de ultrassom, que é um dispositivo que tem a constante formação de biofilmes³⁸. Assim, o uso de sabonetes desinfetantes poderia ser considerado uma maneira fácil e de baixo custo para desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais.

Em estudo prévio³⁹, foram avaliadas as propriedades de uma resina acrílica de base após imersão em sabonetes líquidos desinfetantes (Dettol, Lifebuoy, Protex) em diferentes períodos de tempo. Para todos os tipos sabonetes foram encontradas concentrações inibitórias mínimas para *Candida albicans* em altas diluições, o que demonstra a eficácia dos mesmos para esse propósito. Além disso, as soluções foram

eficazes quando a capacidade de reduzir o biofilme da superfície dos corpos de prova de resina acrílica foi avaliada, tendo as marcas comerciais Dettol e Lifebuoy eliminado totalmente o biofilme formado. Outro resultado positivo desses estudos foi a classificação dos três sabonetes testados como não citotóxicos, além de não promover alteração na rugosidade das amostras. Apenas o sabonete Lifebuoy diminuiu significativamente os valores de dureza e produziu maior efeito na alteração de cor das resinas acrílicas, mas de acordo com a relevância clínica, para todos os grupos, as alterações encontradas foram classificadas como imperceptíveis ou leves.

Tendo em vista os resultados favoráveis obtidos em estudos laboratoriais, este trabalho propõe um estudo clínico para avaliar a efetividade de sabonetes desinfetantes na redução de micro-organismos presentes em próteses totais. É importante ressaltar a facilidade do método proposto para a desinfecção dessas próteses, principalmente se levarmos em consideração os pacientes idosos com destreza manual deficiente. Além disso, a imersão de próteses em sabonetes líquidos desinfetantes poderá ser protocolo em hospitais e clínicas de repouso para o cuidado das próteses dos pacientes institucionalizados e hospitalizados.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar, em um estudo clínico controlado do tipo cross-over, a efetividade das soluções de sabonetes líquidos desinfetantes (Dettol e Lifebuoy) no controle do biofilme presente em próteses totais superiores removíveis. A hipótese a ser testada é que os sabonetes líquidos desinfetantes têm efeito no controle desse biofilme. E a hipótese nula a ser testada é que as soluções de sabonetes líquidos desinfetantes não têm efeito no controle do biofilme.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura foi dividida em três tópicos, melhor detalhados a seguir, de forma a estabelecer uma conexão lógica entre os assuntos abordados.

3.1 *Candida* spp.

Dentre os fungos de interesse médico, as leveduras do gênero *Candida*, apresentam importância devido à alta prevalência em infecções humanas. Espécies de *Candida* são importantes patógenos fúngicos, classificadas como leveduras comensais eucariotas inofensivas, pertencentes ao filo Ascomycota. É comum encontrá-las vivendo em harmonia em fontes ambientais (solos), humanas (trato gastrointestinal e urogenital) e em outros mamíferos. Podem se tornar oportunistas quando há um desequilíbrio entre mecanismos de defesa do hospedeiro e virulência do micro-organismo, se tornando uma das principais causas de infecções superficiais e profundas ameaçadoras para a vida, especialmente em hospedeiros hospitalizados e imunocomprometidos⁴⁰⁻⁴².

As infecções por *Candida* (candidoses) são multifatoriais e sabe-se que sua incidência aumentou consideravelmente nos últimos 30 anos, principalmente devido ao aumento da epidemia de AIDS, população com maiores taxas de longevidade, ao maior número de pacientes imunocomprometidos, ao uso mais difundido de dispositivos médicos internos (drenos), ao aumento de usuários de próteses dentárias, ou em função de pacientes que estão recebendo tratamento com antibióticos ou corticosteroide, sendo esses fatores considerados predisponentes para o micro-organismo se tornar oportunista⁴³.

Apenas algumas espécies de *Candida* são de importância clínica em seres humanos, incluindo *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida dubliniensis*. *C. albicans* é a espécie mais prevalente e mais patogênica, sendo responsável pela maioria dos casos de candidíase oral e sistêmica bem como candidemias hospitalares e nosocomiais⁴⁴⁻⁴⁶. No entanto, enquanto estudos micológicos mostraram que *C. albicans* representa mais de 80% dos isolados de todas as formas de candidoses humanas nas últimas duas décadas⁴⁷, o número de infecções por espécies de não *Candida albicans* (NCAC) aumentaram significativamente⁴⁸⁻⁵⁰. O aparente aumento do envolvimento das espécies NCAC na

candidose humana pode ser explicado devido às melhorias nos métodos diagnósticos, como o uso de meios cromogênicos, com capacidade de diferenciação de espécies de *Candida*, e a introdução de novas técnicas moleculares no diagnóstico rotineiro de fungemia⁵¹.

Um estudo de vigilância no Brasil mostrou uma incidência de 249 casos de candidoses por 1000 internações hospitalares, o que é de 2-15 vezes maior do que nos países do hemisfério norte, como os Estados Unidos⁵². A maioria dessas infecções é endógena, embora haja um risco grave de aquisição de *Candida* spp. do ambiente hospitalar por dispositivos de plástico contaminados, e pela contaminação cruzada dos funcionários nesse ambiente^{46,53-54}. Estudos epidemiológicos mostraram que as infecções por espécies de *Candida* muitas vezes surgem por fatores internos, e as cepas com colonização persistentes são mantidas pelos hospedeiros em períodos prolongados de tempo, sofrendo ocasionalmente pequenas variações genéticas conhecidas como microvariações⁵⁵⁻⁶⁰.

Independentemente da explicação de como ocorreu essa mudança, dados epidemiológicos recentes revelam uma alteração micológica encontrada, e enquanto a *C. albicans* continua sendo o agente etiológico mais comum, sua incidência relativa na infecção está diminuindo com o aumento da prevalência de outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*⁶¹⁻⁶³. Foi observado em 2007, um estudo sobre a epidemiologia da candidose invasiva, que *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram coletivamente responsáveis por cerca de 95% das infecções identificáveis por *Candida*⁶⁴, porém também é importante salientar que há variações significativas no isolamento de espécies de *Candida* dependendo da região geográfica e do grupo de pacientes, com algumas espécies NCAC sendo mais prevalentes, mesmo em comparação com *C. albicans*, em alguns países⁶⁵.

Em um recente estudo epidemiológico realizado em 12 centros médicos brasileiros, *C. tropicalis* foi a segunda espécie de *Candida* mais recuperada, respondendo por 33-48% de todos os casos de candidose⁶⁵⁻⁶⁶.

Alguns estudos in vivo de infecção de candidose sugerem que a *C. albicans* é a espécie mais patogênica⁶⁷, e investigações in vitro indicam que ela também expressa níveis mais altos de possíveis fatores de virulência em comparação com outras espécies⁶⁸.

Espécies de *Candida* podem colonizar e causar doenças em vários locais anatomicamente distintos, incluindo a pele, cavidade oral, trato gastrointestinal, vagina

e sistema vascular. Para estabelecer a infecção, os patógenos oportunistas têm que fugir do sistema imunológico, sobreviver, se reproduzir no ambiente hospedeiro e, no caso de infecção sistêmica, disseminar-se para novos tecidos e órgãos⁶⁹. O evento primário na infecção por *Candida* é a aderência às superfícies do hospedeiro, o que é necessário para a colonização inicial. A adesão é considerada essencial no estabelecimento da doença, e as espécies de *Candida* podem aderir facilmente às superfícies de vários dispositivos (próteses, drenos, etc.) e formar biofilmes. O perfil das proteínas da parede celular é um dos fatores que são mais citados na influência da adesão, assim como as propriedades físico-químicas da superfície celular⁷⁰. A ligação inicial de *Candida* a hospedeiros e/ou dispositivos é seguida por divisão celular, proliferação e subsequente o desenvolvimento de biofilme⁷¹. A formação de biofilme é um importante fator de virulência para várias espécies de *Candida*, pois confere resistência significativa à terapia antifúngica, limitando a penetração de substâncias através da matriz, e protegendo as células das respostas imunes do hospedeiro⁷²⁻⁷³.

Sabe-se que os biofilmes formados pelas espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram associados a taxas mais altas de morbidade e mortalidade, em comparação as espécies incapazes de formar biofilmes⁷⁴. Pouco se conhece sobre a composição da matriz dos biofilmes de espécies da NCAC, porém alguns estudos mostram que a matriz do biofilme de *C. albicans* é composta principalmente de carboidratos, proteínas, fósforo e hexosaminas⁷⁵. Além disso, Al-Fattani e Douglas⁷⁶, em 2006, mostraram que o material da matriz extraído de biofilmes de *C. tropicalis* e *C. albicans* continha carboidratos, proteínas, hexosamina, fósforo e ácido urônico. No entanto, o principal componente nas matrizes de biofilme de *C. tropicalis* foi a hexosamina (27%).

Um aspecto intrigante da interação entre o hospedeiro humano, e a flora microbiana que coloniza a superfície da pele, e das mucosas é a tolerância imunológica. *C. albicans* coloniza a pele, mucosas genitais e/ou intestinais de 30-70% dos indivíduos sadios, e, portanto, é digno de nota que, em circunstâncias normais, o fungo não causa doença significativa. Entretanto, na ausência de reconhecimento imunológico adequado, e a incapacidade de controlar a colonização de *C. albicans* em superfícies mucosas, pode levar a uma infecção grave. Na cavidade bucal, a fase inicial da candidose ocorre com a adesão de *C. albicans* nas células epiteliais da mucosa, e então há o crescimento e invasão aos tecidos. Porém, os mecanismos

envolvidos na produção dos fatores de virulência são complexos, e podem variar de acordo com o local, a fase de invasão e a natureza imunológica do hospedeiro⁷⁷.

Existem algumas formas da adesão de *C. albicans* à superfície da mucosa, tais como forças de van der Waals, as forças de London e interações hidrófobas. As células epiteliais da mucosa não apenas fornecem uma barreira física que tentam impedir a invasão, mas também reconhecem fungos e respondem produzindo citocinas. *C. albicans* interage intimamente com essas células epiteliais não fagocíticas, tanto na fase de comensalismo como também durante a fase de invasão, as superfícies mucosas em indivíduos saudáveis são frequentemente colonizadas por *C. albicans*. O número relativamente pequeno de células de levedura presentes não induz dano celular epitelial e, portanto, não desencadeia uma resposta de citocinas em células epiteliais ou em macrófagos da mucosa. A doença invasiva ocorre quando *C. albicans* consegue atravessar essa barreira de células através da endocitose, em que o fungo é internalizado pelas células epiteliais. Embora tanto a levedura quanto as hifas possam induzir a endocitose, acredita-se que as hifas de *C. albicans* sejam mais eficientes em estimular esse processo, sendo uma forma mais virulenta dessa espécie de *Candida*⁷⁸. Outra maneira é a congregação de leveduras com bactérias orais⁷⁹, que pode criar um ambiente ácido, facilitando a proliferação da *C. albicans*. Além disso, existe maior facilidade da *C. albicans* em aderir-se em poliestireno na presença de *Streptococcus* spp, podendo assim correlacionar-se com a sua adesão em resina acrílica⁸⁰.

Infecções de patógenos fúngicos como as de *C. albicans* são difíceis de erradicar, e podem evoluir se tornando fatais para o paciente, dependendo de sua condição imunológica. A formação de biofilmes de *C. albicans* é um fator de virulência crucial que a torna 30 a 2.000 vezes mais resistente a vários agentes antifúngicos, em comparação com as que não formam biofilmes⁷².

3.2 Biofilme

É observado que, em seus ambientes naturais, a maioria dos micro-organismos cresce aderida às superfícies extracelulares dentro de um ecossistema estruturado (biofilme), em vez de permanecer como organismos flutuantes livres (planctônicos)^{72,80}. Nesses ambientes, muitas vezes, os nutrientes são escassos e, então, pela necessidade de sobrevivência, as células livres passam para o estado de biofilmes, colonizando superfícies. Para que isso ocorra, inúmeros processos físicos,

biológicos e químicos estão envolvidos. Espécies de *Candida* são capazes de formar biofilme, com algumas variações em cada espécie. Por exemplo, biofilmes maduros de *C. albicans* exibem uma estrutura mais heterogênea, composta por blastóforos e hifas, circundados por uma matriz extracelular de material polissacarídeo. Por sua vez, o biofilme de *C. tropicalis* corresponde a uma rede de leveduras, pseudo-hifas e hifas, com intensa brotação de hifas⁸².

O biofilme na maioria das vezes se forma em uma interface de duas fases, que compreende à adesão de células microbianas, dentro de uma matriz formada por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios⁸³, que são derivados de fontes microbianas e ambientais. O progresso da formação do biofilme é iniciado através da ligação de baixa afinidade de células planctônicas a um substrato, seguido por alta adesão de afinidade mediada por receptores específicos. Assim microcolônias desenvolvem-se após o crescimento, e a divisão das células ligadas ao substrato, seguindo o processo e o recrutamento de células planctônicas, que leva ao desenvolvimento posterior da comunidade, podendo haver recrutamento de espécies bacterianas heterotípicas, e/ou a adesão inicial por múltiplas espécies, levando à formação de comunidades multiespécies (polimicrobianas), o que representa a situação mais comum na natureza⁷⁹.

Assim, podemos entender o biofilme de *C. albicans* como um protetor para as bactérias, dificultando sua destruição física, além de agir como uma barreira protetora contra substâncias imunes do hospedeiro, e a penetração de agentes antifúngicos. A formação do biofilme de *C. albicans* pode ser entendido melhor se separarmos em estágios. O primeiro estágio ocorre quando se tem adesão a uma camada basal, que ocorre após o início da incubação. Este estágio de aderência inicial é regulado por fatores não específicos, como interação hidrofóbica ou eletrostática, e fatores específicos, através de receptores específicos como fibrinogênio e fibronectina.

O segundo estágio ocorre quando células leveduriformes de *C. albicans* aderentes se multiplicam continuamente, e as células começam se transformam em prolongamentos filamentosos, podendo ser do tipo pseudohifas ou em hifas, que então formando assim grandes estruturas tridimensionais (denominadas microcolônias). As microcolônias do biofilme são geralmente constituídas por leveduras, pseudo-hifas e hifas, que podem sintetizar substâncias poliméricas extracelulares que comporão a matriz extracelular, que envolverá as microcolônias.

O estágio final da maturação do biofilme é o processo de aumento quantitativo de substâncias extracelulares. De uma maneira mais simples, podemos explicar a formação de biofilme seguindo etapas sequenciais, mesmo sabendo que podem ocorrer simultaneamente, a primeira etapa começa com a aderência de células de levedura a um substrato (dispositivos médicos, odontológicos, estruturas dentais, etc.). Então as células de levedura iniciam a fase de proliferação por toda a superfície e produzem projeções alongadas que se desenvolvem em formas filamentosas, podendo ser caracterizadas de hifas ou pseudo-hifas (etapa de iniciação). A matriz extracelular acumula-se e aumenta sua estrutura e densidade a medida que o biofilme amadurece, podendo causar também resistência a drogas (etapa de maturação). Por fim as células não aderentes a matriz extracelular, são liberadas do biofilme para o meio circundante (etapa de dispersão)⁸⁴.

A sobrevivência dessas espécies em comunidades de biofilme, em relação às que permanecem em condições planctônicas são abundantes, visto que a matriz extracelular formada por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), e a presença de células persistentes que sobrevivem a baixas taxas metabólicas, favorecem para que ocorra o fenômeno amplamente descrito de sensibilidade reduzida aos agentes antimicrobianos⁸⁵.

Os biofilmes também são mais resistentes à remoção mecânica e à morte pelo sistema imune do hospedeiro⁸⁶. A densidade e a disposição de um biofilme serão afetadas por inúmeros fatores, dentre eles o pH, nutrientes, oxigênio, tempo de formação do biofilme, visto que um biofilme maduro, que cresce ao longo de dias, terá uma composição diferente de um biofilme que é mecanicamente removido e formado diariamente⁸⁷.

Um fator muito citado na capacidade de virulência de *C. albicans*, é a sua capacidade de oscilar através de estados morfológicos e fenotípicos diferentes, influenciada diretamente pelo ambiente em que se encontra. *C. albicans* utiliza o chamado quórum sensing (QS) para se comunicar com outras células de *Candida*. QS é acionado por moléculas solúveis de detecção de quórum ou autoindutores, que são secretados no ambiente de maneira dependente da densidade. QS regula várias características patogênicas, incluindo o crescimento de hifas (forma mais virulenta da *Candida*). Esse fenômeno é influenciado pelo "efeito inóculo", onde a formação de hifas é reprimida em células cultivadas em altas densidades. As formações de células de leveduras são facilmente dispersas a partir dos biofilmes maduros⁸⁸.

Sabe-se que os biofilmes contendo *Candida* são fundamentais para que haja o desenvolvimento da candidose oral, mas características dos biofilmes de *Candida* com a interação de outras espécies estão cada vez mais sendo estudadas, e já foi observado que esses biofilmes são significativamente afetados pela saliva, tipo de substrato e pela presença de outros micro-organismos⁸⁹.

A grande maioria dos estudos sobre a formação de biofilme foi realizada *in vitro*, porém, em um estudo *in vivo*, utilizando amostra animal, foram demonstradas algumas diferenças na formação de biofilme. Andes et al.⁹⁰ acompanhou o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* em um cateter venoso central de rato. Foi observado que a duração da fase inicial da formação de biofilme *in vivo* foi menor do que a observada *in vitro*, com várias camadas de células de leveduras e hifas já presentes após 8 h de formação de biofilme *in vivo*, e após 24 horas de formação o biofilme já poderia se considerar maduro. Bezerra et al.⁹¹ verificaram que o biofilme de *C. tropicalis* é uma estrutura composta principalmente por células em forma de levedura, embora algumas linhagens apresentem formas filamentosas em biofilmes espessos de células coagregadas, ou em monocamadas descontínuas de leveduras ancoradas à superfície. Um isolado específico mostrou produzir biofilme com uma fina camada de hifas encapsuladas na matriz. Curiosamente, embora os biofilmes de *C. tropicalis* tenham uma MEC com baixo teor de carboidratos e proteínas, eles foram mais resistentes ao descolamento da superfície do que aqueles formados por *C. albicans*.

Existem muitos desafios para se combater a formação dos biofilmes, e as infecções causadas por eles visto que, até o presente momento, as alternativas resolvem apenas parcialmente os problemas. O biofilme acarreta na persistência bem-sucedida de infecções por *Candida* spp, sendo estas mais resistentes, e associadas a altas taxas de mortalidade. Os antifúngicos ainda são limitados, mas os mais usados são a anfotericina B e a nistatina, que agem sobre a membrana da célula fúngica, sendo fungicidas. O uso desses antifúngicos é ainda mais dificultado por sua baixa absorção pelo intestino. A anfotericina B é considerada o antibiótico mais eficaz no tratamento de infecções fúngicas crônicas. No entanto, seu uso difundido tem sido prejudicado por altos custos e, pelas altas doses necessárias, podendo causar resistência, deixando a infecção mais forte⁹². Há ainda drogas fungistáticas de uso interno, como o fluconazol e o itraconazol. Contudo, essas drogas têm induzido a resistência microbiana, por isso necessita-se a busca de tratamentos alternativos. Portanto, o tratamento e a prevenção de biofilmes de *Candida* devem sofrer melhorias,

para que uma solução eficaz possa ser aplicada. É válido ressaltar que o conhecimento específico sobre todos os mecanismos por trás da formação de biofilme de cada espécie de *Candida* é crucial para tais melhorias, principalmente novos estudos sobre espécies de NCAC, que estão emergindo como importantes patógenos humanos⁸².

A contribuição dos biofilmes de *C. albicans* na etiologia da estomatite protética foi avaliada por Ramage et al.¹. Foram recolhidas amostras de biofilmes das próteses com swabs estéreis, e isolados representativos de *C. albicans* recuperados foram utilizados para investigar a cinética do desenvolvimento do biofilme in vitro. Os biofilmes de *Candida* foram visualizados por MEV (microscopia eletrônica de varredura) diretamente sobre as amostras retiradas de próteses de pacientes com estomatite protética. Esses biofilmes mostraram uma propensão a aderir ao longo de rachaduras e imperfeições da resina acrílica. Os isolados clínicos de *C. albicans* foram capazes de formar biofilmes in vitro. O teste de suscetibilidade indicou que os biofilmes resultantes apresentaram resistência aumentada ao tratamento antifúngico. Concluiu-se que os biofilmes de *Candida* desempenham um papel importante na instalação de doenças infecciosas.

3.3 Agentes Desinfetantes

A correta limpeza da prótese é importante não apenas para controlar a presença de biofilme, prevenindo a infecção da mucosa e o estabelecimento da doença, mas também para a longevidade e sucesso do tratamento realizado. A associação dos métodos mecânico (escovação) e químico (agentes de desinfecção) é a mais indicada. Dentre os agentes químicos podemos citar o hipoclorito de sódio, a clorexidina e o glutaraldeído. O mais utilizado é o hipoclorito, considerado eficaz, não abrasivo e simples de usar.

Em um ensaio clínico randomizado cruzado relacionou-se algumas propriedades como a remissão de estomatite, remoção de biofilme e ação antimicrobiana com o uso de soluções de hipoclorito de sódio, e óleo de *ricinus communis* (8%) como agentes limpadores de prótese. A hipótese nula testada foi que a imersão em limpadores de prótese teria o mesmo efeito que as soluções de controle nas propriedades testadas. Para o estudo ocorrer foram necessários cinquenta portadores de prótese dentária com estomatite protética. Os voluntários foram instruídos a escovar suas próteses (escova e sabonete) e imergi-las (20 minutos/14

dias) em 4 soluções, da seguinte forma: C (controle), solução salina a 0,85%; SH1, hipoclorito de sódio a 0,1%; SH2, hipoclorito de sódio a 0,2%; e RC, 8% de *Ricinus communis*. O biofilme na superfície da parte interna das próteses maxilares foi corado, fotografado e quantificado por *software* (*Image Tool*). Além disso, o biofilme foi coletado, e a suspensão obtida foi diluída e semeada em CHROMagar para *Candida* spp. Após a incubação, as unidades formadoras de colônias por mililitro foram calculadas. A remissão da estomatite por dentadura foi classificada de acordo com a classificação de Newton. Os dados foram analisados pelos testes de Friedman ($\alpha = 0,05$) e Wilcoxon e corrigidos pelo teste de Bonferroni ($\alpha = 0,005$). As duas soluções de hipoclorito de sódio foram os meios mais eficazes de controle do biofilme. Todas as soluções testadas foram eficazes na redução dos sinais de estomatite protética⁹³.

Foi realizada uma revisão de literatura com o objetivo de discutir os mecanismos de ação do hipoclorito de sódio a partir das suas propriedades antimicrobianas. Foi constatado que ele é capaz de promover modificações celulares biossintéticas, alterações no metabolismo celular, degradação de ácidos graxos e lipídeos. Esses fatores são responsáveis por causar a alteração da biossíntese celular, e danos irreversíveis, resultando em morte celular. Além de potente antimicrobiano, o hipoclorito de sódio foi considerado uma solução biocompatível em baixas concentrações⁹⁴. Apesar dos resultados positivos, é importante considerar que o uso do hipoclorito de sódio está associado à inúmeros problemas e desvantagens. A concentração e o tempo de imersão são fatores que podem afetar adversamente a prótese, clareando a resina acrílica e corroendo os componentes metálicos em caso das próteses parciais removíveis.

A eficácia antifúngica de clorexidina a 4%, e de hipoclorito de sódio a 2% em biofilmes de 24 horas de *C. albicans* foi avaliada por um grupo de pesquisa. Para o experimento, foram confeccionados corpos de prova de resina acrílica, e biofilmes de *C. albicans* foram formados em suas superfícies. Em seguida as amostras foram expostas às soluções por 2, 4, 6, 8 ou 10 minutos. Os corpos de prova foram analisados com microscopia confocal de varredura a laser, e técnica de ensaio de viabilidade celular. O biovolume da subpopulação viva do biofilme foi calculado com *software* de análise de imagem de biofilme. Os biovolumes encontrados após 6-10 minutos de exposição à clorexidina, foram significativamente diferentes do biovolume após 2 minutos de exposição. A redução mais efetiva do biovolume foi encontrada após o uso do hipoclorito de sódio. A exposição a 10 minutos de hipoclorito de sódio

a 2% removeu as células fúngicas mais efetivamente do que todos os outros grupos experimentais. A solução de clorexidina mostrou atividade antifúngica contra o biofilme de *C. albicans*, mas não diminuiu o biovolume para os níveis de hipoclorito de sódio²⁷.

Jagger et al.⁹⁶ concluíram que o uso de hipoclorito de sódio pode ser empregado na concentração de 5,25%, que é uma combinação de cloro ativo com bases fortes, ou em concentrações menores, de 2%, 1% ou até mesmo diluída a 0,5% para a limpeza eficaz de próteses. O tempo de imersão varia de acordo com a concentração utilizada. A concentração indicada da solução de hipoclorito de sódio é de 0,525% com imersão de 10 minutos para uma eficaz desinfecção da superfície protética, seguido de enxague e imersão em água por toda a noite para minimizar as principais desvantagens, como a possibilidade do clareamento das resinas acrílicas, a corrosão dos componentes metálicos, impregnação do material em profundidade, causando irritação aos tecidos moles e sabor desagradável.

Outros autores⁹⁵ avaliaram a eficácia de imersão da prótese em uma solução química desinfetante de glutaraldeído 2%, sobre alguns níveis dos micro-organismos salivares, e em alguns parâmetros salivares, como pH e capacidade tampão. Além disso avaliaram a prevalência de candidose, e a influência da prótese após a imersão. Para esse estudo foram selecionados quarenta e três pacientes parcialmente desdentados. Os pacientes foram aconselhados a escovar normalmente suas próteses como já faziam, e durante um período de 4 semanas, imergirem suas próteses durante a noite, de forma aleatória, quer numa solução desinfetante (Grupo 1) ou em uma solução placebo (Grupo 2), e antes de coloca-las na cavidade oral, deveriam lava-las bem em água corrente, para evitar qualquer possível influência da solução na mucosa. Foi constatado uma diminuição de microbiotas salivares, e redução da colonização *C. albicans* nas próteses. Porém, a desinfecção não foi recomendada como tratamento único, e sim como agente profilático, sendo necessário para pacientes usuários de próteses.

As superfícies das resinas acrílicas utilizadas para serem base em próteses parciais e totais removíveis, são atrativos depósitos para componentes orgânicos e inorgânicos. A frequência e a quantidade de acúmulo desses componentes podem ser influenciadas por ilimitados fatores, podendo citar alguns principais como composição salivar, ingestão alimentar, textura superficial e porosidade do material para a base da prótese, idade da prótese e o tipo de limpeza utilizada pelo usuário. Por exemplo, a

microporosidade da superfície desses materiais de resina acrílica, proporciona um ambiente favorável para o crescimento de micro-organismos, podendo causar infecções⁹⁶. A higienização efetiva da prótese é essencial para sua longevidade e remoção dos componentes depositados, além de ser fundamental para evitar doenças causadas por micro-organismos colonizadores das bases acrílicas.

A imersão diária das próteses em soluções desinfetantes pode causar a incorporação de substâncias tóxicas na resina acrílica, que pode ser liberada no meio bucal e, conseqüentemente, provocar irritação ou reação alérgica da mucosa bucal⁹⁷. Como faltavam estudos avaliando o efeito cumulativo de soluções desinfetantes em base de prótese e materiais de reembasamento, Masetti et al.³⁴ realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o potencial citotóxico da base de prótese e das resinas acrílicas, após imersão em soluções desinfetantes em culturas celulares. Para realizar o teste de citotoxicidade celular, foram confeccionados corpos de prova em forma de disco de resina de base de prótese (Vipi wave), e de material reembasador (Tokuyama). Após 48 horas, os corpos de prova foram divididos em grupos (n = 9) de acordo com o tipo de solução desinfetante: água destilada (grupo controle), digluconato de clorexidina a 2%, sódio a 3,8% perborato, hipoclorito de sódio a 0,5% e vinagre de maçã. Os corpos de prova foram armazenados para 0, 1, 3, e 6 meses, e as soluções foram trocadas diariamente. Os corpos de prova tanto de base quanto de reembasamento ficaram 8 horas imersos em solução desinfetante, e 16 horas imersas em água destilada, diariamente, simulando desinfecção noturna das próteses, as soluções foram trocadas diariamente. Para a análise do efeito citotóxico das substâncias incorporadas e liberadas pelos corpos de prova, foram obtidos extratos dessas amostras. O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelas resinas foi avaliado pelo método de cultura de células de queratinócitos humanos (HaCaT: 0341), após as 24 horas de incubação, foi realizado o teste de Alamar Blue®. Como resultados este estudo mostrou que houve efeito cumulativo das soluções de digluconato de clorexidina a 2% e vinagre de maçã na citotoxicidade das resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses, uma vez que houve redução do metabolismo celular, que a imersão das amostras de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses em água destilada, perborato de sódio a 3,8% e hipoclorito de sódio a 0,5% não influenciou o metabolismo celular dos queratinócitos independentemente do tempo de imersão e que as duas resinas acrílicas avaliadas

tiveram comportamento semelhante em relação à sua biocompatibilidade após imersão nas diferentes soluções.

Da Silva et al.⁹⁸, também avaliaram a eficácia de soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina a 2%, glutaraldeído a 2,5% e vinagre a 100%) na remoção de cinco espécies microbianas, (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, ou *Bacillus subtilis*) sob amostras de resina acrílica para base de prótese. Além disso, as características topográficas da resina acrílica após a desinfecção foram avaliadas. Trezentos e cinquenta espécimes de resina acrílica foram contaminados pelos micro-organismos acima citados e, posteriormente, foram imersos em desinfetantes por 10 minutos; o grupo controle não foi submetido a qualquer processo de desinfecção.

Em um estudo paralelo, com o objetivo de avaliar o efeito do desinfetante testado sobre a superfície da resina, 60 amostras foram analisadas num rugosímetro digital antes e depois de dez ciclos de 10 minutos de imersão nos desinfetantes. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído a 2%, e digluconato de clorexidina a 2% foram mais eficazes contra os micro-organismos pesquisados, seguido de vinagre 100%, perborato de sódio a 3,8%, e as pastilhas de perborato de sódio. A rugosidade superficial das amostras foi maior após desinfecção com ciclos de perborato de sódio 3,8% ($p = 0,03$) e menor após os ciclos com digluconato de clorexidina a 2% ($p = 0,04$). Dentro das limitações deste experimento, pode-se concluir que hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído a 2%, clorexidina a 2%, vinagre 100% e perborato de sódio a 3,8% são alternativas válidas para a desinfecção de resina acrílica⁹⁸.

A efetividade, as vantagens e desvantagens de produtos para a higienização de próteses foram descritas em uma revisão de literatura. O método mais citado nesse estudo foi a de higienização mecânica com escova dental, porém as desvantagens de se utilizar esse método também foram citadas, como o desgaste da resina acrílica das bases das próteses e a preocupação de não ser suficiente para diminuir a quantidade de micro-organismos presentes nas superfícies. Concluiu-se, que a forma mais efetiva de diminuir/erradicar os micro-organismos é através da combinação de métodos, a mais recomendada é a combinação do método mecânico juntamente com o método químico. As soluções químicas mais utilizadas encontradas nessa revisão foram: hipoclorito de sódio, peróxidos, peróxidos neutros com enzimas, ácidos e enxaguatórios para próteses⁷⁷.

O efeito do método mecânico e desinfecção química associados no tratamento de candidose foi estudada. Para isso, foram utilizados dois grupos de 30 usuários de próteses totais em tratamento de candidose. Os pacientes do primeiro grupo, foram instruídos a escovar as próteses com sabão de coco seguido pela imersão em uma solução de água filtrada (200 mL) e água destilada (10 mL) (usada como a solução placebo), durante 10 minutos. Os pacientes do grupo 2 receberam instruções para escovar suas próteses com sabão de coco, seguido por imersão em uma solução de água filtrada (200 mL) e 1% hipoclorito de sódio (10 mL), durante 10 min. Os pacientes foram instruídos para limpar as próteses uma vez por dia. Todos os exames clínicos e os dados coletados foram realizados por um único examinador, 15 dias antes e após o início do tratamento. O hipoclorito de sódio é um dos desinfetantes mais antigos e mais utilizados. Pode ser um agente bactericida e fungicida, porque atua diretamente sobre a matriz orgânica da placa, e assim na dissolução da estrutura do polímero, provavelmente por causa da oxidação do componente proteico, reduzindo significativamente a adesão de mais *C. albicans* às células epiteliais bucais. Estas características permitem que o hipoclorito reduza a habilidade adesiva da *C. albicans*, mas ele não funciona como uma barreira anti-invasão, uma vez que não é capaz de evitar a produção de proteases pelos micro-organismos. A melhora clínica foi observada, mas não houve redução significativa de *C. albicans* em ambos os grupos, porém o grupo 2 teve melhora na patogenicidade do micro-organismo, confirmando então a necessidade de recomendar a desinfecção química aos usuários de próteses⁹⁹.

Alguns estudos têm mostrado que menos de 60% dos usuários de próteses usam os produtos químicos, e entre os que utilizam, tem preferência por produtos caseiros, pois são mais fáceis de manejar e possuem um preço mais acessível¹⁰⁰. As características ideais de um agente para limpeza de próteses devem incluir: capacidade de remoção do biofilme e de manchas e ser antibacteriano e antifúngico para reduzir o nível de biofilme de patógenos potencialmente nocivos. Além disso, deve ser não tóxico, ser compatível com os materiais de prótese e não modificar ou degradar a superfície da resina acrílica da base de prótese ou dos dentes artificiais. Precisa agir em um período curto (≤ 8 horas), ser fácil de usar para o paciente ou cuidador e ter baixo custo⁷⁷.

Como alternativa, a utilização de sabonetes desinfetantes foi proposta para a desinfecção de próteses, com resultados muito promissores em estudo in vitro. Esse

estudo avaliou as propriedades físicas e biológicas de uma resina acrílica para base de próteses após imersão em sabonetes antissépticos. Corpos de prova foram preparados, e armazenados em soluções distintas por 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Foram testadas as soluções: DW: água destilada a 37 ° C (grupo controle); DS: ciclos de imersão diária em detergente Dettol por 8 horas à temperatura ambiente, seguido de imersão em água destilada por 16 horas a 37 ° C; PS: ciclos de imersão diária no sabão Protex, conforme descrito para o grupo anterior; LS: ciclos de imersão diária no sabonete Lifebuoy, conforme descrito para o grupo DS. Os parâmetros avaliados foram a capacidade de formação de biofilme por *C. albicans*, e redução de biofilmes fúngicos pré-formados, citotoxicidade, rugosidade superficial, dureza e mudança de cor. Para a fase de adesão fúngica, o tipo de sabonete teve efeito estatisticamente significativo, mas após 24 horas, não foram encontradas diferenças entre as soluções ou entre os tempos de armazenamento. Em relação à eficácia da redução do biofilme, houve diferença significativa quando os grupos foram comparados entre si. Dettol e Lifebuoy eliminaram o biofilme pré-formado nos corpos de prova. Além disso, todos os sabonetes foram classificados como não citotóxicos (na linhagem HaCaT), pois não houve diferença na viabilidade celular entre os diferentes grupos, exceto após 21 dias, quando houve diminuição da viabilidade celular, independentemente do tipo de sabão. Em relação à rugosidade, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Lifebuoy diminuiu a dureza da resina, independentemente do tempo de armazenamento. Após 21 e 28 dias de armazenamento, houve um aumento no valor de dureza, independentemente do tipo de sabão. A cor das amostras, de acordo com os valores do *National Bureau of Standards*, variou de 0,27 a 0,58 (ou seja, alterações de cor imperceptíveis ou suaves). Em geral, os sabonetes desinfetantes não foram capazes de prevenir a formação de biofilme, mas todos os sabonetes foram eficazes na redução do biofilme pré-formado. Além disso, todos os sabões eram não citotóxicos e não alteraram a rugosidade superficial, e a dureza³⁹.

A higienização das próteses pode ser comprometida devido a várias limitações, como o processamento e o tipo de material utilizado na confecção da prótese dentária, e a falta de destreza manual dos usuários de próteses dentárias, que muitas vezes já estão em idade avançadas. A higienização efetiva inclui a remoção de micro-organismos, manchas e detritos depositados nas superfícies das próteses, e é necessária para prevenir a formação de biofilmes e impedir o começo de algum tipo de infecção. Ao entregar uma nova prótese ou nas consultas de manutenção é

importante ressaltar a importância da higienização e do uso correto das próteses e agentes de limpeza, objetivando melhorar longevidade da prótese e manter a saúde geral do paciente. A taxa de diminuição de edentulismo, de aproximadamente 10% a cada dez anos, será compensada pelo aumento no crescimento populacional de adultos com mais de 55 anos. Ou seja, a educação em relação ao uso e cuidados com as próteses dentárias não deve ser uma prática em desuso, devido ao crescimento populacional e aumento da expectativa de vida dos idosos. O edentulismo total também parece estar diminuindo.

O estudo dos efeitos de 291 doenças e suas 1160 sequelas ocorridas entre 1990 e 2010 foi relatado. Um total de 68 estudos foram selecionados, e foram incluídas 285.746 pessoas de 26 países com idades acima de 12 anos. Os resultados indicaram que a incidência global de edentulismo total diminuiu de 4,4% para 4,1% entre 1990 e 2010. Claramente, embora um declínio tenha sido observado, o edentulismo não foi eliminado e a prevenção e educação sobre suas causas ainda são necessárias¹⁰¹.

4 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia deste estudo foi dividida em tópicos para ser melhor compreendida. Tratando-se de um trabalho clínico, que foi elaborado parte na clínica de pesquisa do Departamento de materiais e próteses da Faculdade de Odontologia de Araraquara e outra parte em laboratório de microbiologia da mesma unidade.

4.1 Delineamento de Estudo

O estudo foi desenvolvido com base em um modelo de ensaio clínico randomizado controlado e cruzado (crossover), duplo cego, onde nem o pesquisador responsável pela distribuição e coleta das amostras, e os voluntários sabiam qual era o produto utilizado. O modelo crossover foi escolhido para diminuir a quantidade necessária de voluntários e para eliminação da grande variação que pode existir entre os indivíduos em resposta a um tratamento, tendo em vista que todos os pacientes foram selecionados para todos os tipos de tratamento de suas próteses.

Foram testadas duas condições experimentais, a solução de sabonete líquido desinfetante Dettol (10 vezes da concentração inibitória mínima) e solução de sabonete líquido desinfetante Lifebuoy (10 vezes da concentração inibitória mínima)³⁹, e dois controles, hipoclorito de sódio a 0,5%, como controle positivo, e solução salina (PBS), como controle negativo.

Foi estabelecido um período de *washout* de 07 dias entre o uso de uma solução e de outra, com o objetivo de eliminar efeitos residuais do tratamento anterior, visto que o hipoclorito tem o poder de agir em profundidade podendo ficar retido nas bases das próteses (efeito “*carry over*”)¹⁰⁴.

A primeira etapa da pesquisa foi realizada clinicamente, por meio da coleta e armazenamento do biofilme da parte interna das próteses totais superiores, antes e após a imersão, nas soluções desinfetantes.

A segunda etapa da pesquisa foi realizada em laboratório, onde as amostras de biofilme coletadas e armazenadas foram plaqueadas e avaliadas. Os procedimentos clínicos e laboratoriais foram realizados por um mesmo operador dentro do grupo de pesquisa, para ter um maior controle das possíveis variações inerentes à troca de pesquisador.

O cálculo amostral foi realizado na metade da pesquisa e mostrou que, para que houvesse significância estatística, uma amostra de 25 participantes era necessária. Para realização do cálculo do tamanho da amostra utilizou-se assimetria e curtose análise dos dados na estatística descritiva seguida da diferença mínima entre as médias dos tratamentos, desvio padrão do erro e quantidade de tratamentos análises de variância, e entre duas amostras pareadas foi usado para calcular a média diferenças e desvio padrão das diferenças. O teste que mostrou a maior quantidade de tamanhos de amostra foi escolhida. Para todos os testes foi utilizado 0,80 para potência e $\alpha = 0,5$.

4.2 Seleção da Amostra

A amostra foi composta por voluntários desdentados totais superiores que procuraram tratamento em todas as dependências da Faculdade de Odontologia de Araraquara (amostra probabilística).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) da Universidade Estadual Paulista (protocolo 68147217.1.0000.5416 ANEXO B), e também foi cadastrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC: U1111-1212-2144 ANEXO A). Pacientes desdentados totais superiores, que procuraram tratamento na Faculdade de Odontologia de Araraquara, foram convidados a participar do estudo, e aqueles que aceitaram participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C).

Uma amostra de 42 indivíduos¹⁰²⁻¹⁰⁴ passou por uma avaliação inicial que foi composta de: anamnese, com questões sócio demográficas e questões relacionadas à condição de saúde geral do paciente bem como relacionadas ao tempo de uso de suas próteses; exame clínico extra e intra oral, objetivando avaliar as alterações patológicas e avaliação das próteses. Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir.

4.3 Critérios de Inclusão

Para participar do presente estudo, os pacientes deveriam se encaixar nos seguintes critérios:

- ⇒ Ter entre 45 e 80 anos;
- ⇒ Ambos os sexos;

- ⇒ Ser usuário de prótese total removível superior;
- ⇒ Ser dentado total, parcial ou desdentado no arco inferior, desde que houvesse boas condições bucais;
- ⇒ Não utilizar nenhum agente químico de limpeza em suas próteses há 3 meses pelo menos;
- ⇒ Apresentar fluxo salivar normal com média de 0,7 mL/minuto e no mínimo 0,5 mL/minuto. Para isso, foi feito o teste de fluxo salivar para a análise de xerostomia.

Cada paciente recebeu um tubo falcon e realizou a salivação não estimulada pelo período de um minuto. Foram considerados aptos para a pesquisa os voluntários que obtiveram salivação de 0,5 mL/ à 0,7 mL/minuto¹⁰⁵;

- ⇒ Apresentar bom estado de saúde geral por pelo menos 6 meses;
- ⇒ As próteses totais deveriam estar em condições de uso (com estabilidade, sem fraturas e sem a presença de material reembasador);
- ⇒ As próteses não deveriam apresentar mais do que 5 anos.

4.4 Critérios de Exclusão

Durante a seleção, foram excluídos do estudo os pacientes:

- ⇒ Cujas próteses apresentavam problemas na adaptação, necessidade de reembasamento, reparos e ou fraturas;
- ⇒ Com doenças infecciosas sistêmicas (hepatite, AIDS) ou locais;
- ⇒ Que apresentaram candidose oral em qualquer nível, de acordo com a classificação de Newton modificada;
- ⇒ Com doenças graves e limitantes (Parkinson, Alzheimer, demência);
- ⇒ Em tratamento de neoplasias ou que faziam uso de remédios imunossupressores, antibiótico e/ou antifúngico sistêmicos nos três meses anteriores ao estudo;
- ⇒ Com necessidades especiais, deficiências físicas, ou com destreza manual comprometida;
- ⇒ Fumantes;
- ⇒ Doenças dentais no arco inferior como cáries e doenças periodontais;
- ⇒ Diabéticos.

Todos os pacientes não selecionados e que apresentaram alterações durante o exame inicial foram encaminhados para as diferentes clínicas da FOAr, de acordo

com as alterações encontradas, tais como disfunções na ATM, lesões e/ou alterações na mucosa, e receberam instruções de higiene bucal e das próteses (verbalmente e por escrito) de maneira clara e simplificada para o bom entendimento.

Os participantes selecionados para a pesquisa receberam um kit (Figura 1) contendo uma escova específica para próteses totais (escova de prótese BDC 152/153 – Curaprox - Curaden Swiss do Brasil Imp. Exp. Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil), uma escova dental tradicional de cerdas macias para a higienização da cavidade oral (escova dental adulto CS 5460 – Curaprox - Curaden Swiss do Brasil Imp. Exp. Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) e um sabão neutro líquido da marca Limpol, para a higienização de suas próteses.

Figura 1 - Escova dental tradicional de cerdas macias para cavidade oral; Escova específica para próteses; Sabão neutro



Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, os pacientes receberam instruções verbais e escritas em um folheto, contendo o protocolo de higienização descrito abaixo. A linguagem utilizada foi simplificada para melhorar a compreensão do protocolo de higiene.

Folheto 1: Procedimentos realizados pelos pacientes durante 1 mês após a seleção dos pacientes e no período washout:

- 1) Para a escovação, procure utilizar a escova MACIA para seus dentes e para a sua prótese (Figura 2). Procure manter a pia cheia d'água durante a escovação da sua prótese, isso evitará a fratura em caso de queda;

- 2) Durante a escovação dos seus DENTES, dar ATENÇÃO aos locais que foram desgastados para a colocação da prótese;
- 3) Durante a escovação da sua PRÓTESE, dar ATENÇÃO à parte que fica em contato com os dentes;
- 4) É recomendável, se possível, dormir SEM a prótese (Figura 3);
- 5) Para guardar sua prótese, você deve utilizar um recipiente apenas com água. NUNCA utilizar substâncias que contenham cloro (água sanitária), ou qualquer outro produto durante o período experimental e nem deixar a prótese fora d'água, porque ela será danificada (Figura 4).

Figura 2 - Imagens ilustrando a escovação utilizando uma escova específica para prótese



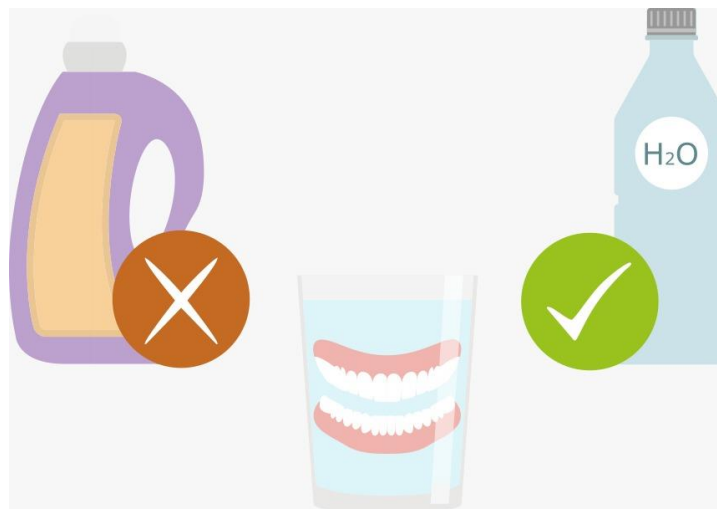
Fonte: Google imagens.

Figura 3 - Imagem ilustrando o período noturno onde deve-se remover as próteses



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Imagem ilustrando que não se deve utilizar nenhum produto para limpeza, apenas água durante o período experimental



Fonte: Elaboração própria.

4.5 Grupos Experimentais e Métodos de Desinfecção

Os pacientes selecionados foram recrutados após 1 mês da primeira consulta. Nesse período de 30 dias eles utilizaram a escova específica para prótese e a escova macia para a cavidade oral, com o objetivo de terem um treinamento de uso, e acostumar com as orientações passadas, como por exemplo de remover a prótese antes de dormir, para a calibração da amostra.

Os pacientes foram randomizados considerando uma sequência numérica aleatória gerada por um programa de computador (Microsoft Excel 2016; Microsoft Corporation, Redmond, EUA). Os participantes, após a randomização, foram instruídos a escovar suas próteses, de acordo com protocolo de higienização descrito acima, e armazená-las em aproximadamente 150 mL de uma das seguintes soluções fornecidas para cada paciente, por 8 horas (overnight), durante 7 dias⁹³. Quatro grupos foram formados em função da sequência de utilização das soluções desinfetantes. (Figura 5):

- A. Hipoclorito de Sódio (grupo HS):** as próteses foram imersas em hipoclorito de sódio 0,5% (grupo controle positivo);
- B. Solução Dettol (grupo SD):** as próteses foram imersas em sabonete líquido Dettol, na concentração de 10 vezes encontradas no CIM (0,39%)³⁹;

C. Solução Lifebuoy (grupo SL): as próteses foram imersas em sabonete líquido Lifebuoy, na concentração de 10 vezes encontradas no CIM (0,78%) (Zoccolotti et al., 2018);

D. Solução PBS (grupo PBS): as próteses foram imersas em solução salina (grupo controle negativo).

Figura 5 - Imagem ilustrando as soluções que foram utilizadas no estudo: hipoclorito, sabonete Dettol, sabonete Lifebuoy, e solução PBS respectivamente



Fonte: Google Imagens.

A marca comercial e a composição química de cada sabonete desinfetante (fornecida pelos fabricantes) estão descritas no Quadro a seguir:

Quadro 1- Marca comercial e composição química dos sabonetes desinfetantes

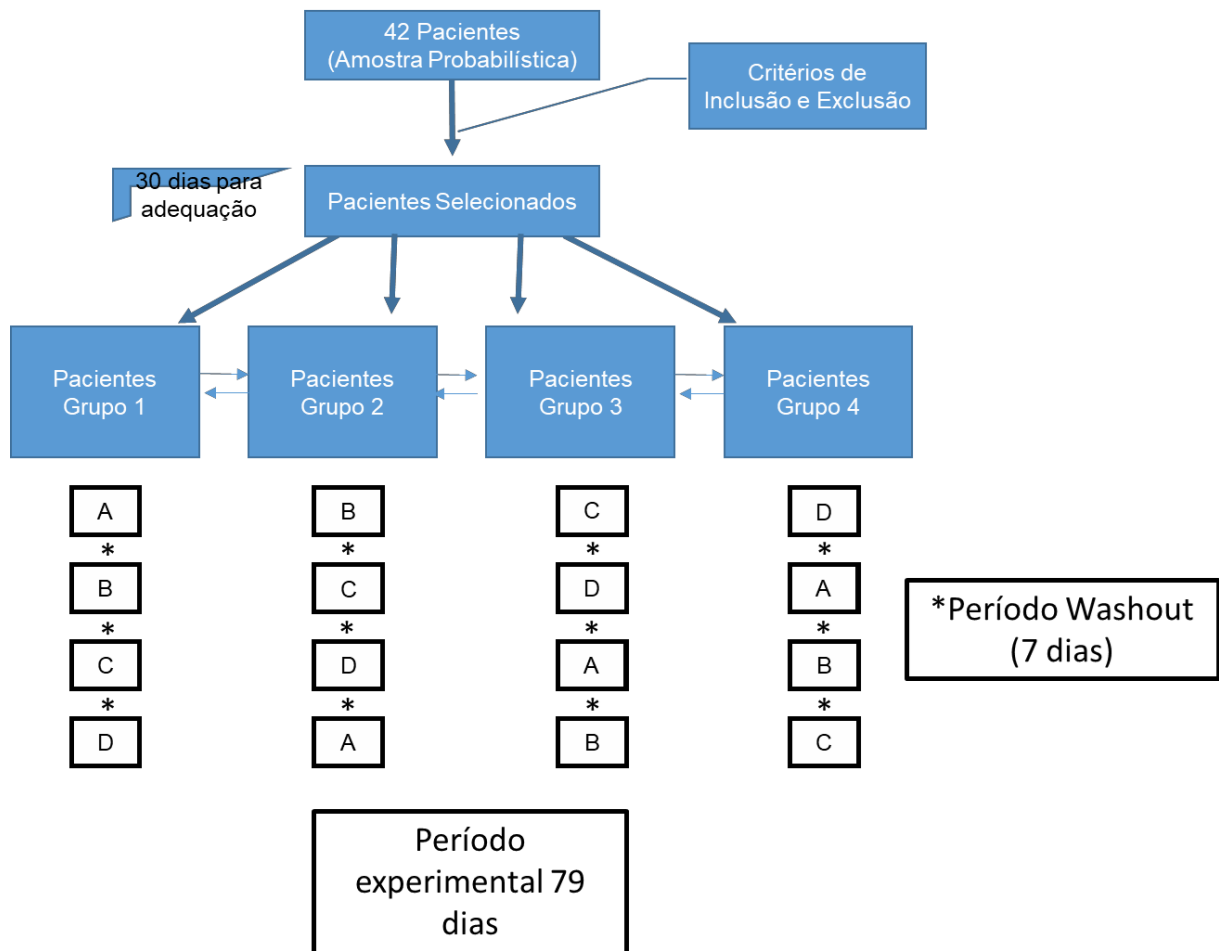
Dettol Aqua, Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropiyl Betaine, Salicylic Acid, Chloroxylenol, Glycerin, Polyquaternium-7, Tetrasodium EDTA, Methylchloroisothiazolinone & Methylisothiazolinone, Acrylates/PEG-10 Maleate, Styrene Copolymer, Parfum, Sodium Hydroxide, Citric acid, Sodium Chloride
Lifebouy Aqua, Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropiyl Betaine, Parfum, Cocamide MEA, Acrylates Copolymer, Sodium Chloride, PPG-9, Lactic Acid, Glycol Distearate, Glycerin, Helianthus Annuus Seed Oil, Sodium Hydroxide, Tetrasodium EDTA, Styrene/Acrylates Copolymer, Dried Cream, Terpeneol, Thymol, Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone, Alpha-Isomethyl ionone, Benzyl Salicylate, Butylphenyl Methylpropional, Citronellol, Coumarin, Geraniol, Hexyl Cinnamal, Limonene, Linalool.

Fonte: Elaboração própria.

Todos os participantes usaram cada solução por sete dias em uma sequência aleatória (randomizada). Após cada período de uso, houve um período de *washout* de 1 semana, durante o qual os pacientes usaram apenas a escova específica, e o sabão líquido neutro para limpar suas próteses dentárias, a fim de eliminar o efeito residual do tratamento prévio (efeito carry over)¹⁰⁶.

A aleatorização da ordem dos voluntários quanto ao recebimento dos produtos foi realizada em uma sequência de 04 possibilidades (quadrado latino 4x4), para que assim, o processo de distribuição de alocações fosse obtido ao acaso. O período experimental total do estudo foi realizado em 79 dias, para cada paciente. A sequência de tratamento acompanha o Fluxograma 1:

Fluxograma 1 - Delineamento do estudo crossover



Fonte: Elaboração própria.

4.6 Coleta de Biofilme da Prótese Total

A coleta do biofilme (Figura 6) foi realizada antes (*baseline*) e após sete dias de imersão nas soluções desinfetantes de acordo com os diferentes grupos experimentais. Para a coleta inicial de biofilme, após o período de 30 dias de adequação, as próteses foram removidas da cavidade oral do paciente e foram lavadas em água corrente. Amostras de biofilme foram recolhidas a partir da superfície interna das próteses (que foi vigorosamente esfregada durante 2 minutos com *swab* estéril). As amostras de biofilme foram colocadas em tubos contendo 1 mL de solução PBS e armazenadas sob refrigeração (0 a 5°) até o plaqueamento. Após a coleta do biofilme, as próteses foram novamente lavadas em água corrente e devolvidas aos pacientes.

Essa etapa de coleta inicial do biofilme foi feita a fim de comprovar que existia a presença de biofilme antes de cada intervenção proposta, sendo assim realizada antes de cada paciente receber a solução desinfetante a ser testada (*baseline*).

Figura 6 - Fotografia da coleta de biofilme sendo realizada



Fonte: Elaboração própria.

4.7 Distribuição do Material

As soluções desinfetantes (500 mL) foram preparadas em laboratório por um pesquisador que não era o responsável por distribuir os materiais aos voluntários, para assim garantir o cegamento da pesquisa (estudo duplo cego). Após o preparo, as soluções desinfetantes foram acondicionadas em frascos idênticos, de cor âmbar, e foram identificados como solução A, solução B, solução C e solução D (Figura 7).

Para a solução do hipoclorito 0,5%, foi realizada a diluição do hipoclorito a 1%

em PBS (250 mL de hipoclorito a 1% e 250 mL de PBS). A solução de Dettol, que tem o MIC igual de 0,39%, foi preparada utilizando 19,5 mL de Dettol e 480,5 mL de PBS. Para realizar a diluição do sabonete Lifebuoy, que tem o MIC igual de 0,78%, foram necessários 39 mL do sabonete e 461mL de PBS. E o controle negativo foi a solução de PBS. Cada paciente recebeu dois frascos de 500 mL da solução que iria utilizar, e foi orientado para que, se acabassem, deveria entrar em contato com o pesquisador para receber mais do produto.

Os grupos foram divididos de acordo com a aleatorização inicial, feita pelo *Microsoft Excel* 2016, por um pesquisador diferente. Posteriormente os materiais foram distribuídos para cada voluntário e foram orientados sobre a correta utilização por um mesmo pesquisador distinto, e cego das demais etapas. Esse pesquisador também foi o responsável pela coleta de biofilme da parte interna da prótese removível superior dos voluntários.

Figura 7 - Soluções desinfetantes condicionadas em frascos idênticos para distribuição aos voluntários da pesquisa



Fonte: Elaboração própria.

No momento da distribuição das soluções, as orientações a seguir foram dadas, em forma de folheto para cada voluntário, e explicadas verbalmente.

Folheto 2 (procedimentos realizados pelos pacientes durante o período experimental):

Escovando a cavidade oral (BOCA) – 3 vezes ao dia durante 2 minutos

1. Remova a prótese;
2. Passe a escova de dentes de cerdas macias que lhe foi fornecida com o dentífrico de sua escolha em todo rebordo (gingiva);
3. Escove o céu da boca (palato) suavemente com movimentos horizontais e verticais;
4. Enxague bem a boca com bochechos de água por 60 segundos;
5. Durante a escovação da sua PRÓTESE, dar ATENÇÃO à parte que fica em contato com os dentes inferiores.

Escovando a Prótese – 3 vezes ao dia durante 3 minutos

6. Escove a dentadura com a escova específica para próteses totais que lhe foi fornecida e sabonete líquido neutro, após cada refeição;
7. Antes de dormir **(A NOITE)**, retire sua dentadura da boca, enxague com água da torneira e coloque a dentadura em um recipiente com 150 mL da solução que você recebeu e deixe por 8 HORAS **(DURANTE TODA A NOITE)**;
8. Ao amanhecer escove a dentadura como recomendado no passo 1 antes de utiliza-la;
9. Repetir durante 7 dias.

4.8 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Os tubos falcons contendo as amostras de biofilme coletados antes, e após cada intervenção foram agitados durante 1 minuto em agitador Vórtex, para desalojar as células do swab estéril. Posteriormente, foram realizadas quatro diluições a partir desta solução. Para isso, uma alíquota de 100 µL da solução foi pipetada, e transferida para outro tubo de ensaio contendo 900 µL de PBS. Este último tubo foi agitado vigorosamente em Vórtex, e uma nova alíquota de 100 µL era removida do mesmo, e colocada em outro tubo de ensaio contendo 900 µL de PBS²⁵. Esse procedimento foi realizado quatro vezes para cada paciente e, dessa forma, as diluições seriadas foram de 10⁻¹ a 10⁻⁴.

Posteriormente, as diluições foram plaqueadas em um seletivo para *Candida* spp (CHROMagar *Candida*, Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, SP, Brazil). As placas foram incubadas a 37 ° C durante 48 horas.

Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias digital (Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara,

SP) e o número de colônias foi determinado. Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Ufc/mL} = \frac{\text{Número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 0 a 4) e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas.

4.9 Análise Estatística

O sabonete líquido desinfetante foi considerado efetivo quando houve a redução de pelo menos 3 logs dos micro-organismos presentes nas próteses em relação ao *baseline*. A porcentagem de redução foi calculada pela subtração dos valores totais de UFC/mL (para cada micro-organismo) obtidos em cada tempo de avaliação em relação ao tempo zero (primeira coleta). O cálculo foi realizado para cada grupo experimental. Os resultados foram tabulados e submetidos ao método estatístico mais adequado. Além disso, foi realizada a análise descritiva dos dados e a normalidade foi averiguada através da assimetria e curtose, e o pressuposto de homocedasticidade foi avaliado pelo teste de Levene.

Para dados dependentes, quando houve normalidade, foi realizado o teste T pareado, e quando não houve normalidade, foi realizado o teste T Wilcoxon. Para a análise de variância o teste estatístico utilizado foi o ANOVA one way com correção de Welch, o pós teste de Games- Howell. Os *softwares* utilizados para as análises descritivas foi o Biostatic 5.0, e para os testes estatísticos foi utilizado o IBM SPSS 20.0. O nível de significância adotado foi de 0,5%.

5 RESULTADOS

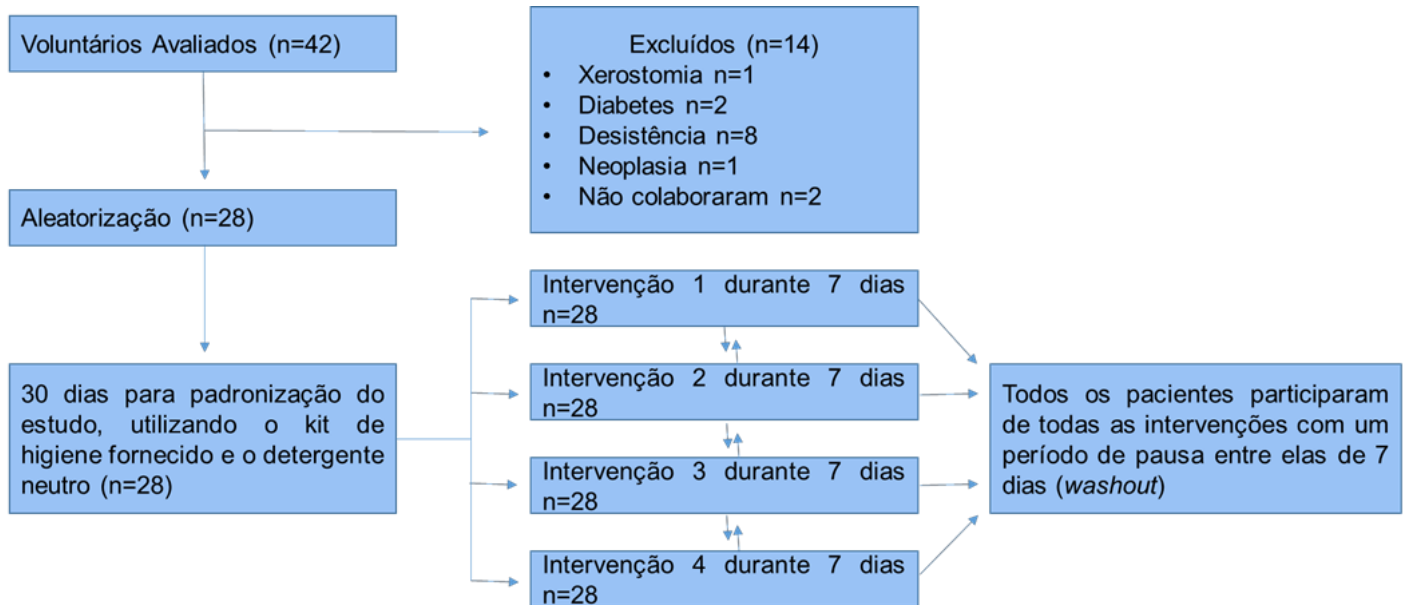
Os resultados deste trabalho foram divididos pelas análises descritivas dos voluntários da pesquisa, pela avaliação da prevalência das espécies de *Candida* identificadas. Foi realizada uma estatística descritiva, onde as diferentes espécies foram organizadas por meio da frequência percentual com que apareceram nas coletas antes, e após as intervenções, e pelas análises estatísticas dos dados coletados. Esta avaliação quantitativa das intervenções foi realizada em tempos distintos: 0 (*baseline*) e em 7 dias (após cada intervenção), para cada paciente.

5.1 Dados Demográficos e Distribuição dos Voluntários nos Diferentes Grupos

Foram avaliados quarenta e dois pacientes, dos quais quatorze foram excluídos em função dos critérios propostos para validar a participação na pesquisa, ou por desistência dos mesmos. Desses quatorze pacientes excluídos, um paciente apresentava xerostomia, dois apresentavam comprometimento do estado de saúde decorrente do Diabetes tipo 1 ou 2 (estando ou não controlada, mesmo com acompanhamento médico), oito pacientes desistiram durante o estudo, um paciente foi diagnosticado com uma neoplasia, e outros dois pacientes não realizaram os procedimentos adequadamente. Estes dados estão representados no Fluxograma 2.

Vinte e oito pacientes atenderam aos critérios de inclusão e compuseram a amostra do estudo. De acordo com o cálculo amostral, seriam necessários 25 pacientes e, sendo assim, o tamanho da amostra foi adequado. Todos os pacientes avaliados receberam os encaminhamentos necessários e instruções de higiene oral e da prótese, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido também receberam o kit de higiene bucal e para prótese.

Desses 28 participantes, 18 eram do sexo feminino e 10 eram do sexo masculino, tendo idade entre 61 e 79 anos, com uma média de idade de 67 anos. Todos residentes do estado de São Paulo.

Fluxograma 2 - Distribution of patients in groups

Fonte: Elaboração Própria.

O Quadro 2 demonstra as características qualitativas e quantitativas da amostra final de 28 pacientes.

A amostra foi dividida aleatoriamente com o auxílio do *software Microsoft Excel* (Quadro 3), buscando dividir os voluntários para as quatro intervenções a serem testadas. Tal procedimento foi realizado por um pesquisador diferente das demais etapas, responsável por apenas esta etapa da pesquisa e cego para todos os demais procedimentos.

Quadro 2- Dados descritivos da amostra selecionada

Voluntários	Gênero	Idade	Condição Arcada Inferior	Tempo de Uso da Prótese Total Superior
Voluntário 1	Feminino	61 anos	Desdentada total	1 ano
Voluntário 2	Feminino	61 anos	Desdentada total	1 ano
Voluntário 3	Feminino	66 anos	Desdentada total	1 ano
Voluntário 4	Feminino	62 anos	Desdentada parcial	1 ano
Voluntário 5	Feminino	65 anos	Desdentada total	1 ano
Voluntário 6	Feminino	67 anos	Desdentada total	1 ano
Voluntário 7	Feminino	67 anos	Desdentada total	6 meses
Voluntário 8	Feminino	70 anos	Desdentada total	9 meses
Voluntário 9	Feminino	73 anos	Desdentada total	3 anos
Voluntário 10	Feminino	62 anos	Desdentada parcial	3 anos
Voluntário 11	Feminino	63 anos	Desdentada total	6 meses
Voluntário 12	Feminino	64 anos	Desdentada total	3 meses
Voluntário 13	Feminino	71 anos	Desdentada total	1 ano
Voluntário 14	Feminino	68 anos	Desdentada parcial	2 anos
Voluntário 15	Feminino	71 anos	Desdentada total	6 meses
Voluntário 16	Feminino	62 anos	Desdentada total	6 meses
Voluntário 17	Feminino	69 anos	Desdentada parcial	6 meses
Voluntário 18	Feminino	79 anos	Desdentada total	6 meses
Voluntário 19	Masculino	74 anos	Desdentada total	6 meses
Voluntário 20	Masculino	71 anos	Desdentada total	6 meses
Voluntário 21	Masculino	69 anos	Desdentada total	4 anos
Voluntário 22	Masculino	71 anos	Desdentada parcial	2 anos
Voluntário 23	Masculino	63 anos	Desdentada parcial	1 ano
Voluntário 24	Masculino	61 anos	Desdentada total	6 meses
Voluntário 25	Masculino	67 anos	Desdentada total	8 meses
Voluntário 26	Masculino	78 anos	Desdentada total	1 ano
Voluntário 27	Masculino	76 anos	Desdentada total	1 ano
Voluntário 28	Masculino	68 anos	Desdentada total	1 ano

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 3 - Voluntários aleatorizados pelo software *Microsoft Excel*

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Voluntario 7	Voluntario 10	Voluntario 8	Voluntario 2
Voluntario 3	Voluntario 9	Voluntario 1	Voluntario 14
Voluntario 5	Voluntario 16	Voluntario 4	Voluntario 11
Voluntario 13	Voluntario 12	Voluntario 15	Voluntario 6
Voluntario 20	Voluntario 23	Voluntario 19	Voluntario 21
Voluntario 28	Voluntario 27	Voluntario 22	Voluntario 26
Voluntario 24	Voluntario 25	Voluntario 18	Voluntario 17

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Identificação das Espécies de *Candida*

Após o plaqueamento em placas de Petri, com meio de cultura de CHROMagar, e incubação de 48 horas, foi realizada a identificação das espécies de *Candida* pela diferenciação das cores (características morfotintoriais), de acordo com a padronização do fabricante apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Identificação de *Candida* spp. e Avaliação do Crescimento Microbiano

Espécies	Características morfotintoriais-CHROMagar
<i>C. albicans</i>	Colônias verdes claras e verde médio.
<i>C. tropicalis</i>	Colônias azuis acinzentadas a azuis esverdeadas ou azuis metalizadas com ou sem halos violetas no meio circundante.
<i>C. glabrata</i>	Colônias cor de malva a malva escuro.
<i>C. krusei</i>	Colônias planas de grande dimensão, cor de rosa claro a vermelho claro com um rebordo esbranquiçado.
Outras	Incolor a bege claro, transparente.

Fonte: Elaboração própria

5.3 Identificação das Espécies de *Candida* da Parte Interna das Próteses Totais

Durante o estudo houve maior prevalência de *C. albicans* e de *C. tropicalis*, respectivamente, tanto antes como após as intervenções com as soluções desinfetantes. Não foi observado em nenhuma das diluições a presença de *C. glabrata* e *C. Krusei*. As Tabelas 1 e 2 mostram a frequência, em porcentagem, de cada espécie antes e após as intervenções realizadas.

Tabela 1- Porcentagem de cada espécie de *Candida* ao longo do período experimental antes das intervenções

Antes	PBS %	HS %	SL %	LD %
<i>C. albicans</i>	87,15	70,98	77,99	81,86
<i>C. tropicalis</i>	12,84	29,01	22	18,13
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0
Outras	0	0	0	0

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2- Porcentagem de cada espécie de *Candida* ao longo do período experimental após as intervenções

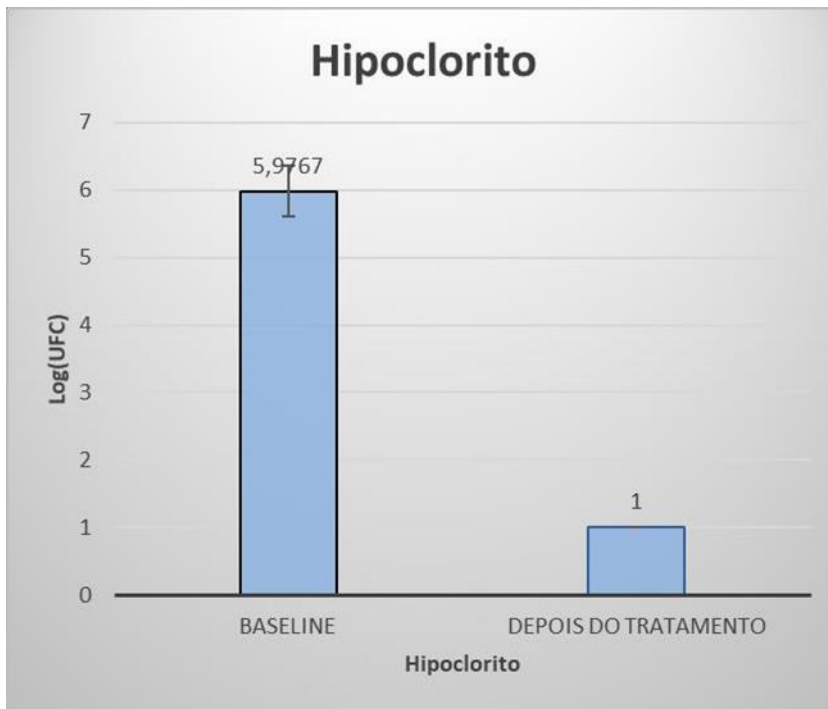
Após	PBS %	HS%	SL%	LD%
<i>C. albicans</i>	88,49	85,36	66,37	92,2
<i>C. tropicalis</i>	11,05	14,63	33,62	7,79
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0
Outras	0	0	0	0

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Avaliação do Efeito das Soluções Desinfetantes Sobre o Crescimento de *Candida albicans*

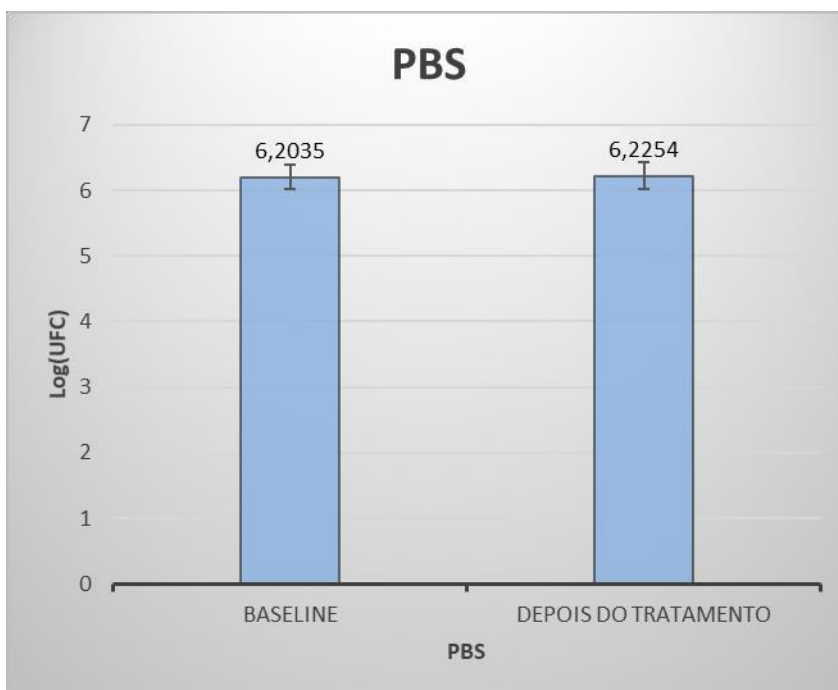
Os Gráficos a seguir (1 a 4) apresentam a contagem de UFC/mL em log₁₀ (UFC+1) das espécies de *Candida albicans*, que foram coletadas e plaqueadas da superfície interna das próteses totais superiores, dos voluntários da pesquisa, no *Baseline* e após cada intervenção separadamente.

Gráfico 1- Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Grupo HS, no *baseline* e após a intervenção de 7 dias. Este grupo apresentou redução na incidência de *Candida albicans* da parte interna da prótese total superior



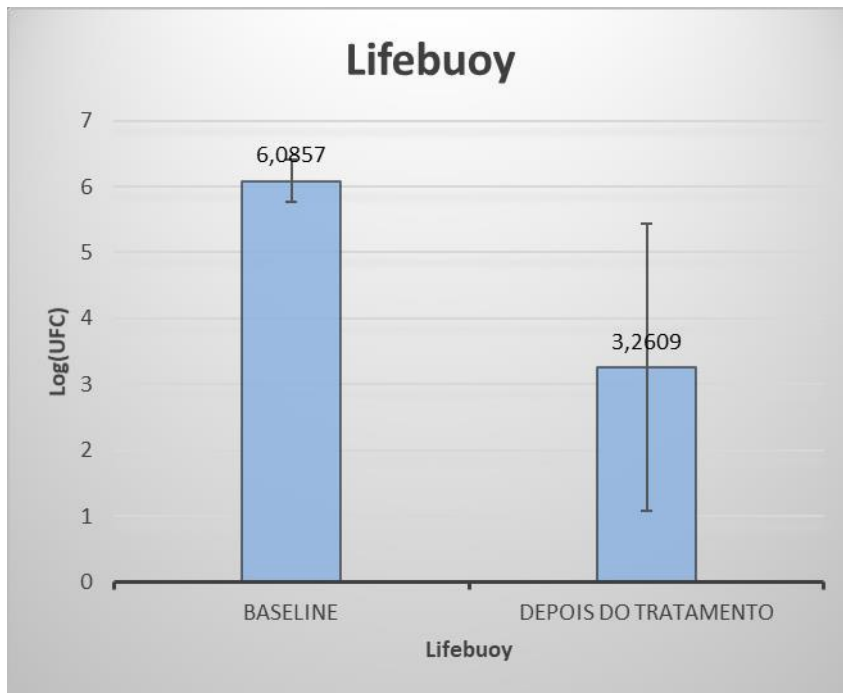
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 2- Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Grupo PBS, no *baseline* e após a intervenção de 7 dias. Neste grupo controle houve a incidência semelhante de *Candida albicans* após o tratamento



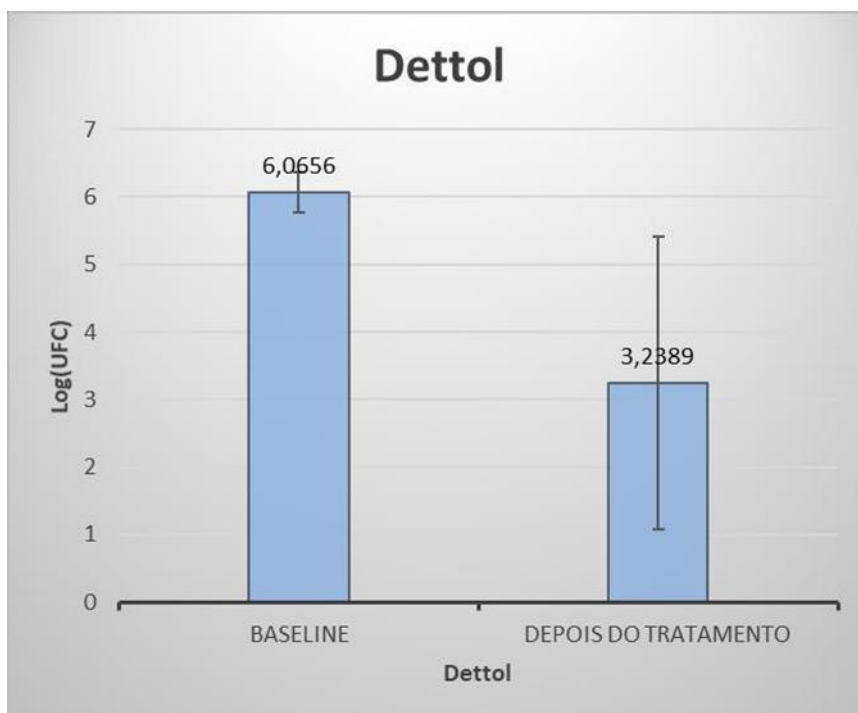
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 3- Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Gupo SL, no *baseline* e após a intervenção de 7 dias. Este grupo apresentou redução na incidência de *Candida albicans* da parte interna da prótese total superior



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 4- Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Grupo SD, no *baseline* e após a intervenção de 7 dias. Este grupo apresentou redução na incidência de *Candida albicans* da parte interna da prótese total superior



Fonte: Elaboração própria.

Na Tabela 3 podemos comparar os resultados das médias e desvio padrão de todos os grupos após os tratamentos. As letras diferentes significam que houve diferença estatística entre os grupos. Onde a letra a é o grupo de Hipoclorito de sódio a 0,5% (controle positivo), a letra b corresponde aos grupos Dettol 10x o MIC e ao grupo Lifebuoy 10x o MIC, e a letra c. corresponde ao grupo PBS (controle negativo).

Os resultados do pós-teste de Games- Howell quando os grupos foram cruzados entre si estão apresentados na Tabela 4. É possível observar que quando comparado o Grupo HS com os demais grupos de intervenções houve uma diferença significativa ($p < 0,05$). Já para os grupos SD e SL não foi observada diferença estatisticamente significativa entre eles. O grupo PBS apresentou diferença estatística para os demais grupos. Foi observada redução estatisticamente significante nos grupos HS ($p < 0,001$), SD ($p < 0,001$), SL ($p < 0,001$), e PBS ($p = 0,643$).

Tabela 3- Resultados das médias e desvio padrão dos grupos após os tratamentos

Grupos	Média	Desvio Padrão
Hipoclorito _a	49,767	0,37325
Dettol _b	28,268	206,048
Leifebuoy _b	28,248	202,193
PBS _c	0,0219	0,24723

Letras diferentes significam que houve diferença estatística entre os grupos. Onde a letra a é o grupo de Hipoclorito de sódio a 0,5% (controle positivo), a letra b corresponde aos grupos Dettol 10x o MIC e ao grupo Lifebuoy 10x o MIC, e a letra c. corresponde ao grupo PBS (controle negativo).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4- Resultados do pós-teste de Games-Howell quando os grupos foram cruzados entre si

Pós teste Games-Howell		
Grupos		p
Hipoclorito	Dettol	0
	PBS	0
	Lifebuoy	0
Dettol	Hipoclorito	0
	PBS	0
	Lifebuoy	1,000
PBS	Hipoclorito	0
	Dettol	0
	Lifebuoy	0
Lifebuoy	Hipoclorito	0
	Dettol	1,000
	PBS	0

Fonte: Elaboração própria.

Através da análise da dimensão do efeito ($n^2 p = 0,605$) podemos observar que o estudo clínico teve um efeito muito elevado, podendo extrapolar este resultado para a clínica. Mostrando que tanto as soluções de sabonetes antissépticos quanto o hipoclorito podem ser utilizados para a redução de *Candida albicans* clinicamente (Tabela 5).

Tabela 5- Dimensão de efeito e poder do teste

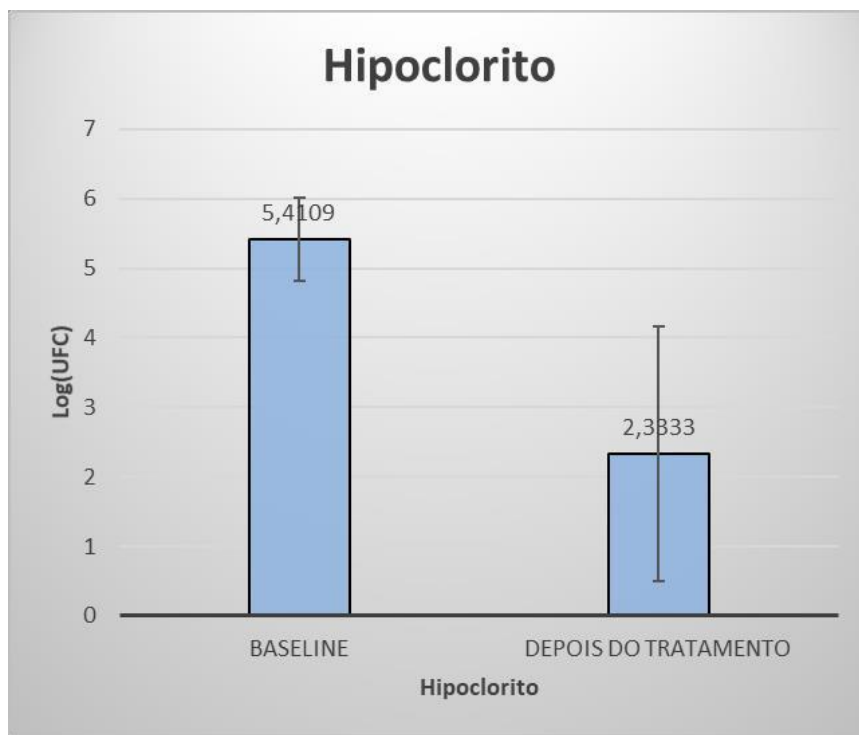
	Estática	Grau de Liberdade 1	Grau de Liberdade 2	p	Dimensão do efeito	Poder do teste
Welch	1,142,346	3	52,869	0	0,605	1,000

Fonte: Elaboração Própria.

5.5 Avaliação do Efeito das Soluções Desinfetantes Sobre o Crescimento de *Candida tropicalis*

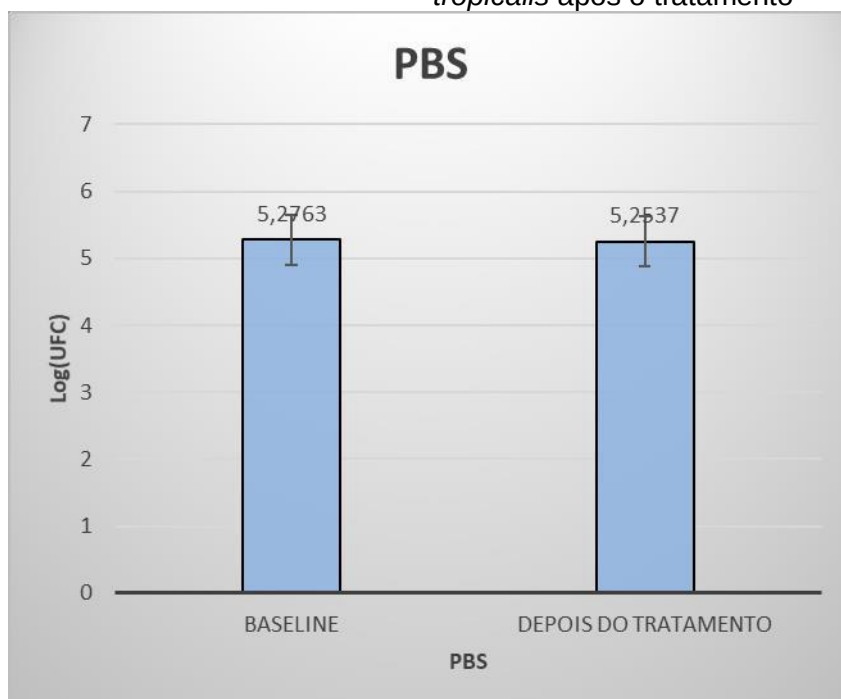
Os Gráficos a seguir (5 a 8) apresentam a contagem de UFC/mL em log₁₀ (UFC+1) das espécies de *Candida tropicalis*, que foram coletadas das próteses totais superiores dos voluntários da pesquisa, antes e após as intervenções de duração de 7 dias.

Gráfico 5- Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Grupo HS, no *baseline* e após a intervenção de 7 dias. Este grupo apresentou redução na incidência de *Candida tropicalis* da parte interna da prótese total superior



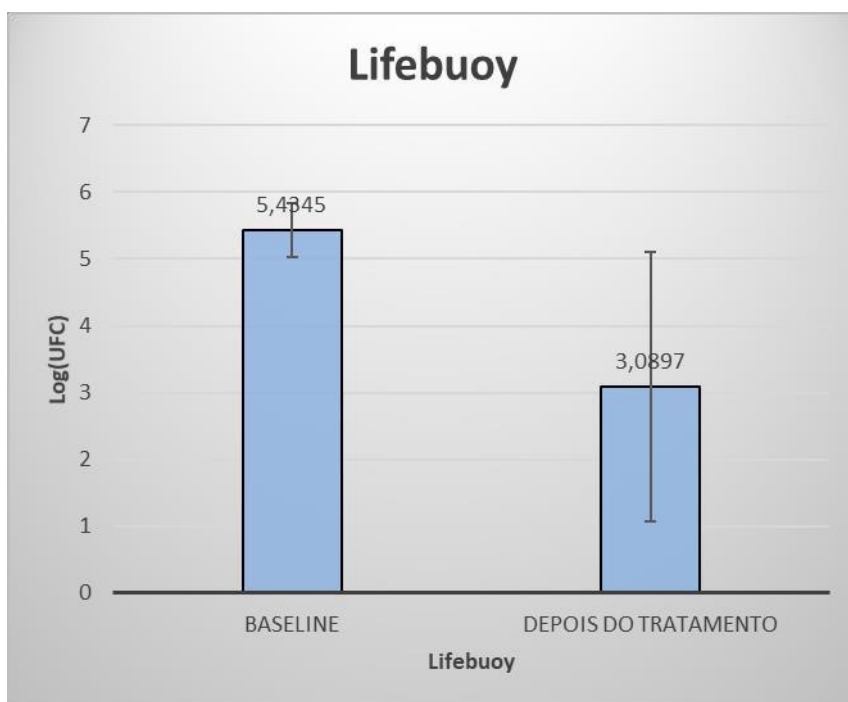
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 6- Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Grupo PBS, no *baseline* e após a intervenção de 7 dias. Neste grupo controle houve a incidência semelhante de *Candida tropicalis* após o tratamento



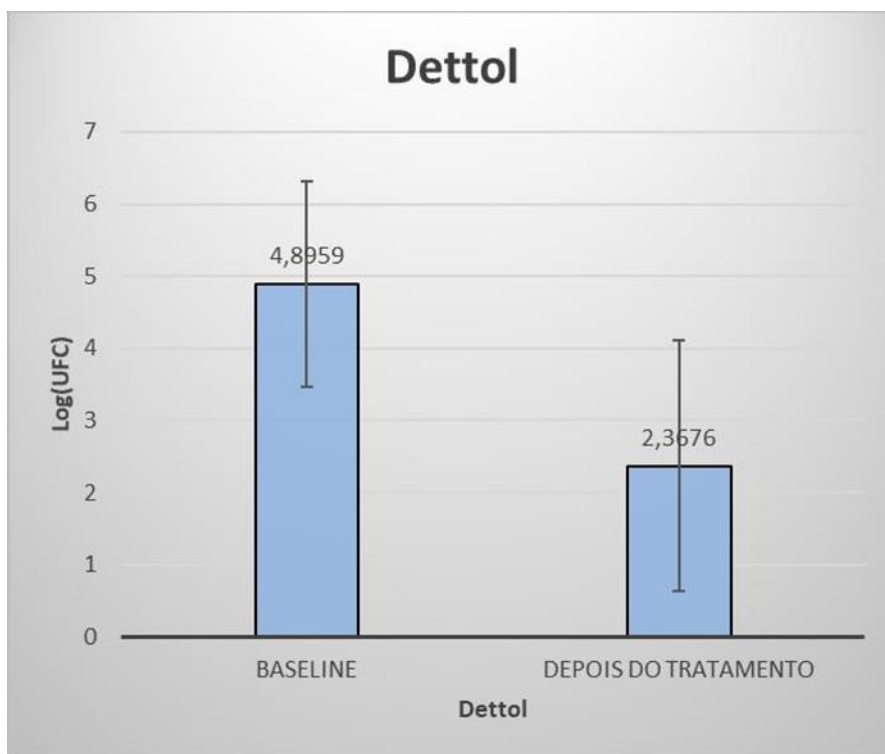
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 7- Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Grupo SL, no *baseline* e após a intervenção de 7 dias. Este grupo apresentou redução na incidência de *Candida tropicalis* da parte interna da prótese total superior



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 8- Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Grupo SD, no *baseline* e após a intervenção de 7 dias. Este grupo apresentou redução na incidência de *Candida tropicalis* da parte interna da prótese total superior



Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 6 mostra o resultado do pós-teste de Tukey quando os grupos foram cruzados entre si. Pode-se observar que os valores do grupo HS (1) e do SS (2), tem uma diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$), também é possível observar uma diferença significativa entre o grupo controle SS e os grupos de sabonete SD (3) e SL (4). Quando comparamos os grupos HS, SD e SL não foi observado diferença significativa, comprovando assim que os três são igualmente eficazes no controle de *Candida tropicalis*.

Tabela 6- Resultado do pós-teste de Tukey quando os grupos foram cruzados entre si

Pós teste de Tukey	Diferença	(p)
Médias (1 a 2)	30,551	< 0.01
Médias (1 a 3)	0,478	ns
Médias (1 a 4)	0,7328	ns
Médias (2 a 3)	25,771	< 0.01
Médias (2 a 4)	23,223	< 0.01
Médias (3 a 4)	0,2548	ns

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A utilização de prótese dental predispõe o usuário a ter alguns tipos de doença, como a estomatite protética, em função do acúmulo de biofilme sob as bases acrílicas. Assim, a correta higienização das próteses removíveis não deveria ser negligenciada. Cabe ao profissional responsável oferecer instruções adequadas de higiene oral e das próteses e realizar um criterioso plano de tratamento com controle posterior regular. Estas ações são alguns dos fatores importantes na prevenção de doenças como a estomatite protética¹⁰⁷. Apesar disso, frequentemente, os pacientes relatam nunca terem sido instruídos por seus dentistas sobre como limpar suas próteses^{23;104}. Concomitantemente, muitos pacientes voluntários da presente pesquisa relataram, informalmente, que a única recomendação fornecida na entrega da prótese foi para higienizá-las após as refeições utilizando, preferencialmente, uma escova dental dura. Alguns dos pacientes informaram que lhes foram recomendados evitar pastas de dentes abrasivas, mas que tinham dificuldade em escolher a pasta correta a ser utilizada. Pelos achados, é possível observar que o profissional de saúde também é responsável pela inadequada higiene dos pacientes. Sendo assim, os programas preventivos deveriam ser mais eficazes e preocupados na promoção de uma boa saúde bucal, e os dentistas deveriam orientar seus pacientes de forma clara sobre a limpeza adequada das próteses e dentes remanescentes e sobre os produtos apropriados a serem usados⁷⁷.

No presente estudo foram incluídos pacientes portadores de prótese total superior com mucosa oral e condições sistêmicas saudáveis. A média de idade dos pacientes foi de 67 anos. Essa faixa etária apresenta um maior risco de desenvolver infecções por fungos, principalmente estomatite, protética em razão do elevado número de usuários de próteses removíveis parciais e totais¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. Ao analisar os participantes da pesquisa, foi observado a presença de 64,28 % de voluntárias do gênero feminino e 35,71% do sexo masculino. Encontra-se na literatura que o sexo feminino tem uma maior frequência de apresentar doenças bucais, como estomatite protética. O estudo de Figueiral et al.¹¹⁰ apresentou que a incidência de estomatite protética no gênero feminino foi de 59,8%, enquanto que no gênero masculino foi de 34,0. A explicação mais plausível para a maior incidência de lesões bucais no gênero feminino, é a presença de alterações hormonais, principalmente no período após a menopausa, e a deficiência de ferro, frequentemente encontrada nas mulheres. Outra

possível explicação é que as mulheres são mais preocupadas com a saúde e procuram seus médicos e dentistas com maior frequência, possibilitando o diagnóstico das doenças¹¹⁰⁻¹¹¹.

A remoção eficaz do biofilme pela escovação exige um certo grau de destreza manual, que é comumente comprometida em idosos¹¹². Desinfecção química, associada ao método de escovação, é considerado o procedimento mais indicado^{22,113}. Em função das desvantagens do uso de algumas soluções químicas utilizadas para a desinfecção de próteses^{5,32}, foi realizado um estudo in vitro prévio com o objetivo de avaliar as propriedades biológicas, mecânicas e físicas de uma resina acrílica para base de próteses após imersão em sabonetes líquidos desinfetantes³⁹. De acordo com esse estudo, o uso de sabonetes desinfetantes poderia ser considerado uma maneira fácil e de baixo custo para desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais. Foram investigados os sabonetes Protex, Lifebuoy e Dettol, que são os sabonetes antimicrobianos mais encontrados em farmácias e mercados. A concentração inibitória mínima de cada sabonete, sua capacidade de formação e redução de biofilme, além das propriedades físicas, mecânicas e citotóxicas foram avaliadas. O estudo foi considerado importante por não haver relatos na literatura com este propósito de uso na Odontologia. O estudo seguiu as recomendações encontradas nos estudos de Shay et al.¹¹⁴, e Cakan et al.¹¹⁵, nos quais foi observado que algumas soluções desinfetantes são mais efetivas quando usadas “overnight”. Portanto, no protocolo utilizado para o estudo preliminar, as amostras ficaram imersas nas soluções 8 horas por dia, durante 28 dias, simulando a desinfecção noturna diária. Os resultados mostraram que Dettol e Lifebuoy eliminaram o biofilme pré-formado nos espécimes. Em geral, os sabões desinfetantes não foram capazes de prevenir a formação de biofilme, mas todos os sabonetes foram eficazes na redução do biofilme pré-formado. Além disso, todos os sabonetes não foram citotóxicos e a maioria não alterou a rugosidade, a dureza e a cor da superfície. Portanto, os autores concluíram que a imersão das próteses removíveis em sabonetes antissépticos pode ser um procedimento de baixo custo e fácil para prevenir a estomatite protética. Com esses resultados positivos demonstrados, foi proposta a presente pesquisa clínica, para comprovar se os resultados encontrados nos estudos in vitro correspondiam com o estudo in vivo.

Apesar de a *C. albicans* ser o isolado clínico mais associado com o

desenvolvimento de estomatite protética, representando mais de 80% das demais espécies⁴⁷, nos últimos vinte anos, o número de espécies de não *Candida albicans* (NCAC) aumentou significativamente⁴⁸⁻⁵⁰. O aparente aumento do envolvimento das espécies NCAC na candidose humana pode ser explicado devido às melhorias nos métodos diagnósticos, como o uso de meios cromogênicos, como o CHROMagar⁵¹ utilizado no presente estudo. CHROMagar *Candida* foi o método usado para identificação de espécies de *Candida albicans* e espécies de não *Candida albicans*. Muitos estudos utilizam este método de identificação como os de Badaró et al.¹¹⁶ e Arruda et al.⁹³.

A interface entre a prótese e a mucosa oferece um ambiente propício, sendo úmido e de temperatura ideal para a colonização de micro-organismos e formação do biofilme^{12,19}. Na maioria dos casos, para se obter resultados satisfatórios, são necessárias concentrações de 5 a 8 vezes maiores que a concentração inibitória mínima (CIM) das células planctônicas. Um estudo anterior usando microscopia eletrônica de varredura mostrou que uma concentração de 11 vezes a da CIM para a anfotericina B não conseguiu interromper o crescimento do biofilme de *C. albicans*¹⁶. Dessa forma, a concentração de dez vezes a inibitória mínima foi utilizada no presente estudo, uma vez que os biofilmes encontrados na parte interna das próteses totais superiores dos pacientes são clinicamente heterogêneos, e esse fenótipo pode ter impacto negativo na vida pacientes¹¹⁷⁻¹¹⁹.

No estudo proposto foram coletadas amostras das bases internas das próteses totais superiores. Foi constatada a maior incidência de *C. albicans*, apresentando frequência entre 66 e 88% nas intervenções analisadas, seguida de *C. tropicalis*, com uma frequência entre 7 e 33%. Um fato importante a salientar sobre os isolados de espécies de *Candida* é que são frequentemente dependentes da região geográfica e do grupo de pacientes⁶⁵. Em um recente estudo epidemiológico realizado em 12 centros médicos brasileiros, *C. tropicalis* foi a segunda espécie de *Candida* mais recuperada, respondendo por 33-48% de todos os casos de candidose⁶⁵⁻⁶⁷. Alguns estudos in vivo de infecção de candidose sugerem que a *C. albicans* é a espécie mais patogênica, e investigações in vitro indicam que ela também expressa níveis mais altos de fatores de virulência em comparação com outras espécies, podendo causar infecções mais perigosas⁶⁷.

Os resultados encontrados na presente pesquisa estão de acordo com outros

estudos, os quais relatam que ambas as espécies são de importância clínica em seres humanos, onde a *C. albicans* é a espécie mais prevalente e mais patogênica, sendo responsável pela maioria dos casos de candidíase oral e sistêmica^{43-45,68}. Os dados encontrados no estudo correspondem com os de Calderone et al.¹²⁸, no qual foi relatado que a *C. albicans* representa mais de 80% dos isolados de todas as formas de candidoses humanas. Podemos citar também o estudo de Sanitá et al.¹⁰⁸, que comparou a prevalência das diferentes espécies de *Candida* isoladas de pacientes diabéticos com pacientes não diabéticos, com ou sem estomatite protética. O estudo mostrou que *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada, observada em 81,9% dos 210 pacientes, seguida de *C. tropicalis*, não tendo diferença estatística entre os pacientes diabéticos e não diabéticos.

Para a análise do efeito de cada solução na redução dos micro-organismos de *C. albicans* e *C. tropicalis*, foram usados como grupo controle negativo o PBS e como grupo controle positivo o hipoclorito de sódio a 0,5%, por ser considerado “padrão ouro” na literatura. O PBS é uma solução salina e não apresentou ação significativa no aumento ou redução de micro-organismos, como esperado. O hipoclorito de sódio a 0,5% é o agente químico de limpeza de primeira escolha em muitos estudos, uma vez que inativa o biofilme microbiano e inibe a formação de cálculo²⁶⁻²⁷.

No presente estudo, hipoclorito de sódio a 0,5% foi capaz de reduzir mais de 3 logs de micro-organismos para todos os pacientes, mostrando sua alta efetividade antifúngica, tanto para espécies de *Candida albicans*, como para *Candida tropicalis*. Apesar de apresentar bons resultados na capacidade antimicrobiana, sabe-se que em concentrações maiores que 1% pode causar efeitos citotóxicos moderados aos tecidos bucais, além de promover branqueamento das bases acrílicas e corrosão dos componentes metálicos das próteses³⁰⁻³¹. Jagger et al.⁹⁶ concluíram que o uso de hipoclorito de sódio pode ser empregado em concentrações menores de 2%, 1% ou 0,5% para a limpeza eficaz de próteses. O tempo de imersão varia de acordo com a concentração utilizada. A concentração indicada da solução de hipoclorito de sódio é de 0,525% com imersão de 10 minutos para uma eficaz desinfecção da superfície protética, seguido de enxague e imersão em água por toda a noite para minimizar as principais desvantagens, como a possibilidade do clareamento das resinas acrílicas, a corrosão dos componentes metálicos, impregnação do material em profundidade, causando irritação aos tecidos moles e sabor desagradável⁹⁶. Além disso, os efeitos

sobre as propriedades físicas e mecânicas do uso dessa solução a longo prazo deveria ser melhor investigado. Em estudo recente¹²⁰ foi verificado que a imersão de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses em tempo prolongado (6 meses) em hipoclorito de sódio 0,5% produziu alterações na topografia da superfície de ambas as resinas. Foi verificado também que essas alterações aumentaram de acordo com o tempo de armazenamento, causando degradação da superfície. Fato positivo foi encontrado no estudo de Masetti et al.³⁴ no qual foram investigados os efeitos citotóxicos de amostras de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses após imersão em longo prazo (6 meses) em diferentes soluções desinfetantes. O armazenamento em hipoclorito de sódio a 0,5% não causou alterações no metabolismo celular dos queratinócitos, independentemente do tempo de imersão. Foi observado também que as duas resinas acrílicas avaliadas (base e reembasamento de prótese) tiveram comportamento semelhante em relação à sua biocompatibilidade após imersão nas diferentes soluções.

Em relação aos grupos experimentais, ambos os sabonetes líquidos (Dettol e Lifebuoy) foram eficazes na redução dos dois tipos de micro-organismos isolados da base interna das próteses totais dos voluntários. No caso da *C. albicans*, as soluções tiveram a capacidade de zerar a contagem de micro-organismos ou reduzir em 3 logs de UFC/mL. Estes resultados estão de acordo com os resultados do estudo in vitro realizado por Zoccolotti et al.³⁹ onde após 8 horas de imersão, todas as soluções dos sabonetes desinfetantes foram capazes de reduzir o biofilme formado sobre os corpos de prova de resina acrílica, sendo que o Dettol e o Lifebuoy eliminaram totalmente esse biofilme da superfície das amostras.

Ao analisar a redução da *C. tropicalis*, pode se observar que as duas soluções tiveram ação sobre o micro-organismo, porém inferior a 3 logs UFC/mL. Bezerra et al.⁹¹ verificaram que o biofilme de *C. tropicalis* é uma estrutura composta principalmente por células em forma de levedura, embora algumas linhagens apresentam formas filamentosas em biofilmes espessos de células coagregadas ou em monocamadas descontínuas de leveduras ancoradas à superfície. Um isolado específico mostrou produzir biofilme com uma fina camada de hifas encapsuladas na matriz. Curiosamente, embora os biofilmes de *C. tropicalis* tenham uma matriz extracelular com baixo teor de carboidratos e proteínas, eles foram mais resistentes ao descolamento da superfície do que aqueles formados por *C. albicans*³¹. Essa

resistência ao deslocamento pode ser explicada pelo tamanho menor das colônias de *C. tropicalis*. Uma possível solução para aumentar a eficácia dos sabonetes seria a utilização das soluções associada à higienização mecânica, podendo assim aumentar sua capacidade de ação, além das imersões noturnas. Porém, estudos deveriam ser realizados.

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

No estudo de Devine et al.¹²¹, foi investigado a efetividade do EDTA tetrassódico, um dos compostos tanto do sabonete Dettol quanto do Lifebuoy, para desinfetar produtos odontológicos que sofrem contaminação, como material de base de prótese e escovas de dente. Os efeitos sobre as espécies de *Candida* foram avaliados por causa do papel desses organismos nas infecções associadas à prótese. Em 16 h, o EDTA tetrassódico reduziu as contagens viáveis de bactérias salivares e de biofilme de *C. albicans* em mais de 99% e removeu a maioria ou todos os biofilmes da superfície do material. A exposição prolongada (6 dias) da base de material para prótese ao EDTA tetrassódico teve o benefício adicional de reduzir a formação subsequente de biofilme por micro-organismos salivares.

O cocamidopropyl betaine é um detergente pseudo-anfotérico derivado de alquil betaínas de cadeia longa. Por ser considerado menos irritante que o lauril sulfato de sódio, seu uso se expandiu para muitos produtos de higiene. Ele tem a função de desmanchar os óleos e gorduras, de maneira menos irritante que o laurel sulfato de sódio¹²². Além disso, a betaína é também utilizada como agente de limpeza para o tratamento de feridas infectadas. Neste aspecto, Minnich et al.¹²³ realizaram um estudo in vitro para examinar os efeitos antimicrobianos de uma solução contendo 0,1% de betaína e foi observada redução de 5,3 log a 5,8 log para vários micro-

organismos, dentre eles a *Candida albicans*.

O Triclosan, que é o principal composto que confere característica antimicrobianas ao sabonete Dettol, tem grande espectro de ação para bactérias e para fungos. Ele apresenta boa tolerância para uso na pele e cavidade bucal quando em baixas concentrações. Quando são utilizados em altas concentrações ele tem efeitos negativos para várias organelas citoplasmáticas e de membrana, ou seja, ele se apresenta bacteriostático em baixas concentrações, mas em concentrações mais altas são bactericidas. No caso de produtos comerciais, o Triclosan se encontra em concentrações mais baixas, (como é o caso do sabonete Dettol) e tem ação principal na inibição da síntese dos ácidos graxos. Como essa substância apresenta essa ação de atravessar a membrana celular, ela atua diretamente em uma enzima específica de bactérias e fungos. Ao ligar-se à enzima bacteriana enoil-acil proteína-carreadora redutase (ENR) há um aumento da afinidade da enzima ao dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺). Isto resulta na formação de um complexo ternário estável, de ENR-NAD⁺-triclosan, que é incapaz de participar na síntese dos ácidos graxos (que são necessários para a construção e reposição de membranas celulares e para outras funções vitais dos micro-organismos) provocando a morte da célula devido à desorganização da membrana.¹²⁴

As atividades biológicas dos curcuminóides da cúrcuma são muito embasadas cientificamente, seus derivados possuem efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticâncer, antimicrobianos, neuroprotetores, cardioprotetores e radioprotetores, entre outros, e são muito utilizados por serem compostos naturais. O efeito da ação antifúngica de curcuminóides no crescimento de *Candida albicans* já foi confirmado, onde a existência do grupo metoxi dos compostos pode aumentar a sua lipofilicidade, conferindo à ele a habilidade dissolver gorduras do núcleo celular, o que torna mais fácil a invasão na membrana celular dos fungos, inibindo o seu crescimento¹²⁵⁻¹²⁷.

O hidróxido de sódio, presente na composição do Dettol® e Lifebuoy®, atua como solvente orgânico e de gordura. Além disso, este composto é capaz de neutralizar aminoácidos e degradar ácidos graxos, atuando de forma ativa na parede celular dos micro-organismos, o que lhe confere propriedade antimicrobiana⁹⁴.

Em relação ao ácido cítrico, foi demonstrado que este produto pode ser utilizado como desinfetante de próteses, tendo sido eficaz na redução da viabilidade celular de *Candida albicans* em biofilme maduro¹¹³.

Até o momento, os resultados desse estudo mostram que os sabonetes líquidos poderiam ser uma alternativa para desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais, levando em consideração sua efetividade na redução do biofilme (estudos in vivo e in vitro) e sua não citotoxicidade (estudos in vitro). Além disso, em estudo prévio³⁹ também foi possível observar que os sabonetes não causaram alterações clinicamente significativas nas propriedades físicas e mecânicas das resinas para base e reembasamento de próteses, sendo, portanto, uma alternativa simples, de baixo custo e facilmente encontrado em mercados e drogarias. Porém, estudos a longo prazo deveriam ser realizados.

Este estudo teve como limitações a dificuldade de encontrar pacientes que poderiam ser incluídos na pesquisa e a aceitação por parte dos voluntários em participar da mesma. Além disso, como se tratou de um estudo em que os voluntários levavam as soluções para casa, não tivemos controle da adequada utilização de acordo com as instruções oferecidas em diferentes formulários explicativos, tendo sido excluídos do estudo os pacientes que relataram o uso incorreto das soluções.

7 CONCLUSÃO

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

1. As soluções do sabonete Lifebuoy e do sabonete Dettol tiveram resultados semelhantes e foram eficazes na redução do biofilme de *Candida albicans* e *Candida tropicallis*, sendo mais eficazes na redução de UFC no biofilme de *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS*

- 1 Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida albicans* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98(1): 53-9.
- 2 Helmerhorst EJ, Alagl AS, Siqueira WL, Oppenheim FG. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(12): 1061-70
- 3 Glass RT, Bullard JW, Hadley CS, Mix EW, Conrad RS. Partial spectrum of microorganisms found in dentures and possible disease implications. *J Am Osteopath Assoc.* 2001; 101(2): 92-4.
- 4 Monsenego P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study in vivo. *J Oral Rehabil.* 2000; 27(8): 708-13.
- 5 Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(5): 532- 6.
- 6 Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol.* 2014; 12(5): 405.
- 7 Katharios-Lanwermeier S, Xi C, Jakubovics NS, Rickard AH. Mini-review: microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. *Biofouling.* 2014; 30(10): 1235-51.
- 8 Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci.* 2014; 7(1): 1-7.
- 9 Zhou L, Zhang P, Chen Z, Cai S, Jing T, Fan H, et al. Preparation, characterization, and evaluation of amphotericin B-loaded MPEG- PCL-g-PEI micelles for local treatment of oral *Candida albicans*. *Int J Nanomedicine.* 2017; 6(12): 4269-83.
- 10 Cavalcanti YW, Morse DJ, Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Wei X, Wilson M, et al. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling.* 2015; 31(1): 27-38.
- 11 Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol.* 2000; 18(5): 553-62.
- 12 Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.

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

- 13 Cassone A, Cauda R, De Maria A. High rate of Quantiferon positive and tuberculin negative tests in infants born at a large Italian University Hospital in 2011: a cautionary hypothesis. *Pathog Glob Health*. 2012; 106(1): 8-11.
- 14 Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49(2): 171-7.
- 15 Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol*. 2015; 34(5): 877-86.
- 16 Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003; 11(1): 30-6.
- 17 Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2): 139-43.
- 18 Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(10): 630-42.
- 19 Cross LJ, Williams DW, Sweeney CP, Jackson MS, Lewis MA, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(3): 351-8.
- 20 Pereira-Cenci T, Pereira T, Cury A, Cenci M, Rodriguez Garcia RC. In vitro *Candida albicans* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont* 2007; 20(3): 308-10.
- 21 Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent*. 1998; 26(7): 577-83.
- 22 Felton DA, Cooper L, Duqm I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontics. *J Prosthodont* 2011; 142 (Suppl 1): 1-20.
- 23 Peracini A, Andrade IM, Paranhos H de F, Silva CH, de Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J*. 2010; 21(3): 247-52.
- 24 Sorgini DB, Silva-Lovato CH, Souza RF, Davi LR, Paranhos HFO. Abrasiveness of conventional and specific denture-cleansing dentifrices. *Braz Dent J*. 2012; 25(1): 154-9.
- 25 Gornitsky M, Paradis 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.

- 26 Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent*. 1979; 42(6): 619-23.
- 27 Gama MC, de Oliveira DG, da Silva PM, Ordinola-Zapata R, Duarte MH, Porto VC. Antifungal activity of 4% chlorhexidine and 2% sodium hypochlorite against *Candida albicans* biofilms. *Gen Dent*. 2015; 63(5): 43-7.
- 28 McCourtie J, MacFarlane TW, Samaranayake LP. Effect of chlorhexidine gluconate on the adherence of *Candida* species to denture acrylic. *J Med Microbiol*. 1985; 20(1): 97-104.
- 29 Silva-Lovato CH, Paranhos HFO, Ito IY. Evidenciadores de biofilme em prótese total: avaliação clínica e ação antimicrobiana. *Pesqui Odontol Bras*. 2002; 16(3): 270-5.
- 30 Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfectants in infection control. *Dent Clin North Am*. 1991; 35(2): 323-37.
- 31 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.
- 32 Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effects of various disinfectant solutions on the surface hardness of an acrylic resin denture base material. *Int J Prosthodont*. 1993; 6(1): 9-12.
- 33 Davi LR, Peracini A, Ribeiro Nde Q, Soares RB, da Silva CH, Paranhos Hde F, et al. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. *Gerodontology*. 2010; 27(4): 297-302.
- 34 Masetti P, Amaya Arbeláez MI, Pavarina AC, Sanitá PV, Jorge JH. Cytotoxic potential of denture base and reline acrylic resins after immersion in disinfectant solutions. *J Prosthet Dent*. 2018; 120(1): 155.e1-e7.
- 35 Farzana K, Batool S, Ismail T, Asad MHHB, Rasool F, Khiljee S, Murtaza G. Comparative bactericidal activity of various soaps against gram-positive and gram-negative bacteria. *Sci Res Essays*. 2011; 6(16): 3514-8.
- 36 Larson EL, Lin SX, Gomez-Pichardo C, Della-Latta P. Effect of antibacterial home cleaning and handwashing products on infectious disease symptoms: a randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med*. 2004; 140(5): 321-9.
- 37 Martins CR, Lopes WA, Andrade JB. Organic compound solubility. *Quím Nova*. 2013; 36(8): 1248-55.
- 38 Mwambete KD, Lyombe F. Antimicrobial activity of medicated soaps commonly used by dar es salaam residents in Tanzania. *Indian J Pharm Sci*. 201; 73(1): 92-8.

- 39 Zoccolotti JO, Tasso CO, Amaya Arbeláez MI, Malavolta IF, Pereira ECS, Esteves CSG, et al. Properties of an acrylic resin after immersion in antiseptic soaps: low-cost, easy-access procedure for the prevention of denture stomatitis. *PLoS One*. 2018; 13(8): e0203187.
- 40 Koh AY, Köhler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N, Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS One*. 2008; 4(2): e 35.
- 41 Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(1): 21-31.
- 42 Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis*. 1996; 22(2): 89-94.
- 43 Moran G, Stokes C, Thewes S, Hube B, Coleman DC, Sullivan D. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology*. 2004; 150(10): 3363-82.
- 44 Thompson GR, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4): 488-95.
- 45 Zomorodian K, Rahimi MJ, Pakshir K, Motamedi M, Ghiasi MR, Rezashah H. Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of *Candida* species. *J Glob Infect Dis*. 2011; 3(4): 357-60.
- 46 Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68(3): 278-83.
- 47 Merenstein D, Hu H, Wang C, Hamilton P, Blackmon M, Chen H, et al. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV- infected and noninfected women. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013; 29(1): 30-4.
- 48 Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, et al. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(1): 14-8.
- 49 Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Zavala-Velásquez N, Méndez-Tovar LJ, Naquid-Narváez JM, Torres-Rodríguez JM, et al. Candiduria in type 2 diabetes mellitus patients and its clinical significance. *Candida* spp. antifungal susceptibility. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2008; 46(6): 603-10.

- 50 Ruan SY, Hsueh PR. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2009; 108(6): 443-51.
- 51 Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A, Gallé F, Signoriello G, Colella G, et al. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(1): 76-8.
- 52 Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(8): 2816-23.
- 53 Dorko E, Kmet'ová M, Marossy A, Dorko F, Molokáčová M. Non-albicans *Candida* species isolated from plastic devices. *Mycopathologia.* 1999; 148(3): 117-22.
- 54 Fanello S, Bouchara JP, Jousset N, Delbos V, LeFlohic AM. Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission. *J Hosp Infect.* 2001; 47(1): 46-52.
- 55 Bougnoux ME, Diogo D, François N, Sendid B, Veirmeire S, Colombel JF, et al. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(5): 1810-20.
- 56 Da Matta DA, Melo AS, Colombo AL, Frade JP, Nucci M, Lott TJ. Candidemia surveillance in Brazil: evidence for a geographical boundary defining an area exhibiting an abatement of infections by *Candida albicans* group 2 strains. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(9): 3062-7.
- 57 Gammelsrud KW, Lindstad BL, Gaustad P, Ingebretsen A, Høiby EA, Brandtzaeg P, et al. Multilocus sequence typing of serial *Candida albicans* isolates from children with cancer, children with cystic fibrosis and healthy controls. *Med Mycol.* 2012; 50(6): 619-26.
- 58 Jacobsen MD, Duncan AD, Bain J, Johnson EM, Naglik JR, Shaw DJ, et al. Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS Yeast Res.* 2008; 8(8): 1334-8.
- 59 McManus BA, McGovern E, Moran GP, Healy CM, Nunn J, Fleming P, et al. Microbiological screening of Irish patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy reveals persistence of *Candida albicans* strains, gradual reduction in susceptibility to azoles, and incidences of clinical signs of oral candidiasis without culture evidence. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(5): 1879-89.
- 60 Sampaio P, Gusmão L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C, et al. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8): 3869-76.

- 61 Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001; 183(18): 5385-94.
- 62 Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36(5): 599-607.
- 63 Bassetti M, Righi E, Tumbarello M, Di Biagio A, Rosso R, Viscoli C. *Candida* infections in the intensive care unit: epidemiology, risk factors and therapeutic strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006; 4(5): 875-85.
- 64 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1): 133-63.
- 65 Colombo AL, Guimarães T. Candiduria: a clinical and therapeutic approach. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40(3): 332-7.
- 66 Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sienra RA, Gobara S, et al. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect*. 2009; 72(1): 9-16.
- 67 Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(2): 398-429.
- 68 Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35(8): 484-91.
- 69 Anil S, Ellepola AN, Samaranayake LP. Post-antifungal effect of polyene, azole and DNA-analogue agents against oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates in HIV disease. *J Oral Pathol Med*. 2001; 30(8): 481-8.
- 70 Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008; 72(3): 495-544.
- 71 Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6(7): 979-86.
- 72 Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2): 167-93.
- 73 Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat*. 2004; 7(4-5): 301-9.
- 74 Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002; 5(6): 608-11.
- 75 Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46(3): 397-403.

- 76 Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006; 55(8): 999-1008.
- 77 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.
- 78 Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 10(2): 112-22.
- 79 Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol.* 2013; 28(2): 83-101.
- 80 Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(10): 788-90
- 81 Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987; 41: 435- 64.
- 82 Cavaleiro M, Teixeira MC. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Front Med (Lausanne).* 2018; 13;5: 28.
- 83 Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-33.
- 84 Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(2): 109-18
- 85 Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res.*1991; 37: 91-105
- 86 Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol.* 2005; 175(11): 7512-8.
- 87 Øilo M, Bakken V. Biofilm and dental biomaterials. *Materials (Basel).* 2015; 8(6): 2887–900.
- 88 Mallick EM, Bennett RJ. Sensing of the microbial neighborhood by *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): e1003661.
- 89 Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(2): 86-94.

- 90 Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun*. 2004; 72(10): 6023–31.
- 91 Bezerra TF, Pádua FG, Ogawa AI, Gebrim EM, Saldiva PH, Voegels RL. Biofilm in chronic sinusitis with nasal polyps: pilot study. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009; 75(6): 788-93.
- 92 Zhou L, Zhang P, Chen Z, Cai S, Jing T, Fan H, et al. Preparation, characterization, and evaluation of amphotericin B-loaded MPEG- PCL-g-PEI micelles for local treatment of oral *Candida albicans*. *Int J Nanomedicine*. 2017; 6(12): 4269-83.
- 93 Arruda CNF, Salles MM, Badaró MM, de Cássia Oliveira V, Macedo AP, Silva-Lovato CH, et al. Effect of sodium hypochlorite and *Ricinus communis* solutions on control of denture biofilm: a randomized crossover clinical trial. *J Prosthet Dent*. 2017; 117(6): 729-34.
- 94 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.
- 95 Mahonen A, Jukkola A, Risteli L, Risteli J, Mäenpää PH. Type I procollagen synthesis is regulated by steroids and related hormones in human osteosarcoma cells. *J Cell Biochem*. 1998; 68(2): 151-63.
- 96 Jagger DC, Al-Akham L, Harrison A, Rees JS. The effectiveness of seven denture cleansers on tea stain removal from PMMA acrylic resin. *Int J Prosthodont*. 2002; 15(6): 549-52.
- 97 Bessems E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *Int Biodeterior Biodegradation*. 1998; 41(3): 177-83.
- 98 Da Silva EM, Poskus LT, Guimarães JG, de Araújo Lima Barcellos A, Fellows CE. Influence of light polymerization modes on degree of conversion and crosslink density of dental composites. *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19(3): 1027-32.
- 99 Barnabé W, de Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Sclaro 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.
- 100 Veres EM, Wolfaardt JF, Hnizdo E. Denture cleansers: part II--a survey of instructions given by dentists on denture cleansing. *J Dent Assoc S Afr*. 1985; 40(10): 585-9.
- 101 Felton DA. Complete edentulism and comorbid diseases: an update. *J Prosthodont*. 2016;25(1): 5-20.
- 102 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: 65-71.

- 103** Nunes ÉM, Policastro VB, Scavassin PM, Leite AR, Mendoza Marin DO, Giro G, et al. Crossover clinical trial of different methods of removing a denture adhesive and the influence on the oral microbiota. *J Prosthet Dent.* 2016; 115(4): 462-8.
- 104** Peracini A, Regis RR, Souza RF, Pagnano VO, Silva CH, Paranhos HF. Alkaline peroxides versus sodium hypochlorite for removing denture biofilm: a crossover randomized trial. *Braz Dent J.* 2016; 27(6): 700-4.
- 105** Newman TB, Browner WS, Cummings SR. Delineando estudos de testes médicos. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, Newman TB, organizadores. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica.* 3ª. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2008. p. 201-23
- 106** Salles MM, Badaró MM, Arruda CN, Leite VM, Silva CH, Watanabe E, et al. Antibiofilm activity of complete denture cleanser solutions based on sodium hypochlorite and *Ricinus communis*: a randomized clinical study. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(6): 637–42.
- 107** Jorge JH, Quishida CC, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Giampaolo ET. Clinical evaluation of failures in removable partial dentures. *J Oral Sci.* 2012; 54(4): 337-42.
- 108** Sanita PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Int J Prosthodont.* 2012; 25(3): 232-44.
- 109** Wu T1, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol.* 1996; 44(4): 311-6.
- 110** Figueiral MH1, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(6): 448-55.
- 111** Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48(1): 61-9.
- 112** Brondani MA, Samim F, Feng H. A conventional microwave oven for denture cleaning: a critical review. *Gerodontology.* 2012; 29(2): 6-15.
- 113** Faot F, Cavalcanti YW, Mendonça e Bertolini Md, Pinto Lde R, da Silva WJ, Cury AA. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly (methyl methacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. *BMC Oral Health.* 2014; 14: 77.
- 114** Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract.* 2000 11(2): 28-41.

- 115 Cakan U, Kara O, Kara HB. Effects of various denture cleansers on surface roughness of hard permanent relined resins. *Dent Mater J*. 2015; 34(2): 246-51.
- 116 Badaró MM, Prates TP, Leite-Fernandes VMF, Oliveira VC, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. In vitro evaluation of resilient liner after brushing with conventional and experimental *Ricinus communis*-based dentifrices. *J Prosthodont*. 2019; 28(2): e857-62.
- 117 Rajendran R, Sherry L, Nile CJ, Sherriff A, Johnson EM, Jones BJ, et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection – Scotland, 2012-2013. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 87–93
- 118 Sherry L, Rajendran R, Lappin DF, Borghi E, Perdoni F, Falleni M, et al. Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. *BMC Microbiol* 2014; 14: 182.
- 119 Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1843-50.
- 120 Amaya Arbeláez MI. Efeito da imersão em soluções desinfetantes na capacidade de formação de biofilme de *C.albicans* e características topográficas de uma resina acrílica para base de prótese e um reembasador [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.
- 121 Devine DA, Percival RS, Wood DJ, Tuthill TJ, Kite P, Killington RA, Marsh PD. Inhibition of biofilms associated with dentures and toothbrushes by tetrasodium EDTA. *J Appl Microbiol*. 2007; 103(6): 2516-24.
- 122 Parson LM. Cocamidopropyl betaine. *Dermatitis*. 2008; 19(6) : 49-50.
- 123 Minnich KE, Stolarick R, Wilkins RG, Chilson G, Pritt SL, Unverdorben M. The effect of a wound care solution containing polyhexanide and betaine on bacterial counts: results of an in vitro study . *Ostomy Wound Manage*. 2012; 58(10): 32-6.
- 124 Ciancio S, Panagakos FS. Superior management of plaque and gingivitis through the use of a triclosan/copolymer dentifrice. *J Clin Dent*. 2010; 21(4): 93-5.
- 125 Alalwan H, Rajendran R, Lappin DF, Combet E, Shahzad M, et al. The anti-adhesive effect of curcumin on *Candida albicans* biofilms on denture materials. *Front Microbiol*. 2017; 20(8): 659
- 126 Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC, Mima EGO. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by curcumin-loaded Polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. *Molecules*. 2018;23(8). doi: 10.3390/molecules23082075.

- 127** Sanitá PV, Pavarina AC, Dovigo LN, Ribeiro APD, Andrade MC, Mima EGO. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. *Lasers Med Sci.* 2018; 33(4): 709-17.
- 128** Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trans Microbiol.* 2001; 9(7): 327-35.

❗ Não seguro | www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/view/6211/

Descritores gerais para as condições de saúde:

PT-BR C23: Condições patológicas, sinais e sintomas	ES C23: Condiciones patológicas, signos y síntomas	EN C23: Pathological conditions, signs and symptoms
---	--	---

Descritores específicos para as condições de saúde:

PT-BR C05.500.480: Arcada Edêntula	ES C05.500.480: Arcada Edéntula	EN C05.500.480: Jaw, Edentulous
PT-BR E06.780.346.760.290.504: Prótese Total Superior	ES E06.780.346.760.290.504: Dentadura Completa Superior	EN E06.780.346.760.290.504: Denture, Complete, Upper

❗ Não seguro | www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/view/6211/

Intervenções

Categorias das intervenções

Other

Intervenções:

PT-BR A amostra (n=50) selecionados para a pesquisa de acordo com os critérios de inclusão receberão um kit contendo uma escova específica para próteses total, uma escova dental tradicional de cerdas macias para a higienização da cavidade oral e um sabão neutro manipulado. Em seguida, os pacientes receberão instruções verbais e escritas, devendo seguir o protocolo de higienização. Os pacientes selecionados serão recrutados após 1 mês da primeira consulta e serão randomizados considerando uma sequência numérica aleatória gerada por um programa de computador, em quatro grupos. A. Hipoclorito de Sódio: as próteses serão imersas em hipoclorito de sódio 0,5%	EN The sample (n = 50) selected for research according to the inclusion criteria will receive a kit containing a specific toothbrush for total prostheses, a traditional dental brush of soft bristles for oral cavity hygiene and a manipulated neutral soap. The patients will be recruited 1 month after the first consultation and will be randomized by considering a random numerical sequence generated by a computer program in four groups. Sodium hypochlorite: the prostheses will be immersed in sodium hypochlorite 0.5% (control group); B. Dettol Solution: the prostheses will be immersed in Dettol liquid soap at the 10-fold concentration found in the MIC
---	--

computador, em quatro grupos A. Hipoclorito de Sódio: as próteses serão imersas em hipoclorito de sódio 0,5% (grupo controle); B. Solução Dettol: as próteses serão imersas em sabonete líquido Dettol na concentração de 10 vezes encontradas no CIM (0,39%); C. Solução Lifebuoy: as próteses serão imersas em sabonete líquido Lifebuoy na concentração de 10 vezes encontradas no CIM (0,78%); D. Solução Salina: as próteses serão imersas em solução salina (grupo controle negativo). Todos os participantes usarão cada solução por sete dias em uma sequência aleatória (cross-over). Após cada período de uso, haverá um período de lavagem de 1 semana durante o qual os pacientes usarão apenas a escova específica e o sabão líquido neutro para limpar suas próteses dentárias, a fim de eliminar o efeito residual do tratamento prévio.	B. Dettol Solution: the prostheses will be immersed in Dettol liquid soap at the 10-fold concentration found in the MIC (0.39%); C. Lifebuoy solution: the prostheses will be immersed in Lifebuoy liquid soap in the concentration of 10 times found in the MIC (0.78%); D. Saline Solution: the prostheses will be immersed in saline solution (negative control group). All participants will use each solution for seven days in a random sequence (cross-over). After each period of use, there will be a 1 week wash period during which patients will use only the specific brush and neutral liquid soap to clean their dentures in order to eliminate the residual effect of the previous treatment.	
---	---	--

Recrutamento

Situação de recrutamento: Recruiting

País de recrutamento

Brazil

Data prevista do primeiro recrutamento: 2018-03-10

Data prevista do último recrutamento: 2018-12-10

Tamanho da amostra alvo:	Gênero para inclusão:	Idade mínima para inclusão:	Idade máxima para inclusão:
50	-	45 Y	80 Y

Critérios de inclusão:

PT-BR

Ter entre 45 e 80 anos; Ser usuário de prótese total removível superior; Não utilizar nenhum agente químico de limpeza em suas próteses durante o período da pesquisa e há 3 meses pelo menos; Apresentar fluxo salivar normal com média de 0,7 mL/minuto e no mínimo 0,5 mL/minuto; Apresentar bom estado de saúde geral por pelo menos 6 meses; As próteses totais deverão estar em condições

EN

Be between 45 and 80 years old; To be a user of superior removable total dentures; Do not use any chemical cleaning agent on your dentures during the period of the research and at least 3 months; Present normal salivary flow with mean of 0.7 mL / minute and at least 0.5 mL / minute; Show good general health for at least 6 months; The total dentures should be able to be used (with stability, without fractures and

saúde geral por pelo menos 6 meses; As próteses totais deverão estar em condições de uso (com estabilidade, sem fraturas e sem a presença de material reembasador); As próteses não deverão apresentar mais do que 5 anos.

The total dentures should be able to be used (with stability, without fractures and without the presence of repacking material); The prosthesis should not be more than 5 years old.

Critérios de exclusão:

PT-BR
Cujas próteses apresentarem problemas na adaptação, necessidade de reembasamento, reparos e ou fraturas; Com doenças infecciosas sistêmicas (hepatite, AIDS) ou locais; Que apresentarem Candidose oral em qualquer nível de acordo com a classificação de Newton modificada; Com doenças graves e limitantes; Em tratamento de neoplasias ou que fazem uso de remédios imunossuppressores, antibiótico e/ou antifúngico sistêmicos nos três meses anteriores ao estudo; Com necessidades especiais, deficiências físicas, ou com destreza manual comprometida; Fumantes; Diabéticos.

EN
Whose prosthesis presents problems in the adaptation, need of relining, repairs and or fractures; With systemic infectious diseases (hepatitis, AIDS) or local; That they present oral Candidosis at any level according to the modified Newton classification; With serious and limiting diseases; In the treatment of malignancies or who use immunosuppressive, systemic antibiotic and / or antifungal medicines in the three months prior to the study; With special needs, physical disabilities, or with committed manual dexterity; Smokers; Diabetics.

Desenho do estudo:

PT-BR
Ensaio clínico randomizado controlado e cruzado (crossover)

EN
Randomized controlled and crossover clinical trial

Programa de acesso expandido	Enfoque do estudo	Desenho da intervenção	Número de braços	Tipo de mascaramento	Tipo de alocação	Fase do estudo
None	Prevention	Cross-over	4	Double-blind	Randomized-controlled	N/A

Desfechos

Desfechos primários:

PT-BR
Avaliar, em um estudo clínico controlado, a efetividade das soluções de sabonetes líquidos desinfetantes (Dettol e Lifebuoy) no controle do biofilme presente em próteses totais removíveis

EN
To evaluate, in a controlled clinical study, the effectiveness of solutions of liquid disinfectant soaps (Dettol and Lifebuoy) in the control of biofilm present in total removable dentures

ContatosContatos para questões públicas

Nome completo: Janaina Habib Jorge

Endereço: Rua Humaitá, 1680

Cidade: Araraquara / Brazil

CEP: 14801-903

Fone: (16) 3301-6300

E-mail: janainahj@bol.com.br

Filiação: Faculdade de Odontologia de Araraquara

Contatos para questões científicas

Nome completo: Janaina Habib Jorge

Endereço: Rua Humaitá, 1680

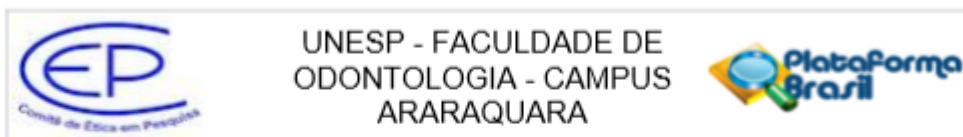
Cidade: Araraquara / Brazil

CEP: 14801-903

Fone: (16) 3301-6300

E-mail: janainahj@bol.com.br

Filiação: Faculdade de Odontologia de Araraquara

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Instituição**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo clínico da efetividade de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme presente em próteses totais.

Pesquisador: Janaina Habib Jorge

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68147217.1.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.113.848

Apresentação do Projeto:

O presente projeto trata em avaliar a efetividade de sabonetes líquidos desinfetantes sobre biofilmes formados em prótese total. Para isto será realizado esfregão com swab para coleta de biofilme da superfície de uma hemiarcada da prótese. Em seguida será realizado o protocolo de desinfecção extra bucal com três tipos de sabonetes desinfetantes durante 20 min e realizada nova coleta da outra hemiarcada. Serão realizadas diluição decimal e plaqueamento para contagem de microrganismos. Após a segunda coleta as próteses serão escovadas e desinfetadas antes de entregá-las aos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, clinicamente, a efetividade de soluções de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme presentes em próteses totais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos da pesquisa serão mínimos, uma vez que a coleta do biofilme será realizada apenas nas próteses dos pacientes e não no palato. Após a desinfecção das próteses, para minimizar o risco de componente residual, após a coleta do biofilme, as próteses serão higienizadas pelo método mecânico de escovação e sabão líquido neutro e devolvidas aos participantes.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

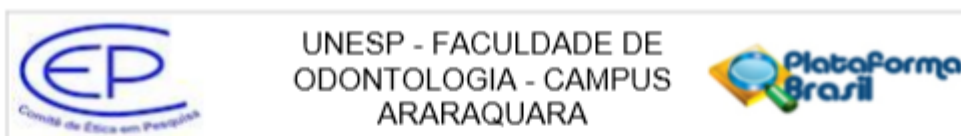
UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.113.848

Benefícios: O presente trabalho trará informações sobre a eficácia de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme de próteses totais, colaborando para a determinação de um protocolo de desinfecção de baixo custo e mais acessível em comparação a vários protocolos pré-estabelecidos. É importante ressaltar que nenhum estudo com os mesmos propósitos foi encontrado na literatura. Além disso, os resultados da presente proposta

trarão informações relevantes as quais possibilitarão a realização de estudos clínicos futuros a respeito de medidas coadjuvantes para o tratamento das infecções fúngicas relacionadas ao uso de próteses. Após a obtenção dos resultados, será desenvolvido um plano para difusão da pesquisa, constituído de seminários, eventos, formação de grupos de

estudo com alunos da graduação e/ou pós-graduação e artigos científicos a serem encaminhados para a publicação em periódicos internacionais com bom fator de impacto. Desenvolver um intercâmbio com pesquisadores que queiram atuar nos temas relacionados a essa linha de pesquisa. Deve-se acrescentar ainda que o desenvolvimento deste projeto contribuirá para a formação de recursos humanos mais qualificados e captação de recursos em outros Órgãos de Fomento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem delineada e com fase experimental utilizando as resinas das próteses totais já realizada e com resultados sobre as consequências destes sabonetes líquidos na estrutura da prótese, mostrando sem alteração. Trará muitos benefícios por se tratar um protocolo de baixo custo e acessível a maior parte dos pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos termos e documentação corretos e de acordo com a normas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram devidamente atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa,

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: HUMAITA 1680	CEP: 14.801-903
Bairro: CENTRO	
UF: SP	Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459	E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 2.113.848

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_917493.pdf	22/05/2017 13:59:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.pdf	22/05/2017 13:59:13	Janaina Habib Jorge	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termodecompromisso.pdf	09/05/2017 16:35:40	Janaina Habib Jorge	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaodeaceitelaboratorio.pdf	09/05/2017 16:35:20	Janaina Habib Jorge	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaodeaceiteclinica.pdf	09/05/2017 16:35:07	Janaina Habib Jorge	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	09/05/2017 16:29:55	Janaina Habib Jorge	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/05/2017 16:29:33	Janaina Habib Jorge	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 12 de Junho de 2017

Assinado por:
Ligia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Por esse instrumento particular declaro, para os fins éticos e legais, que eu,
(nome) _____,
(nacionalidade) _____, portador do RG n. _____,
C.P.F. n. _____ residente à _____

_____, na cidade de _____, Estado de _____, concordo voluntariamente em participar da pesquisa “Estudo clínico da efetividade de sabonetes líquidos desinfetantes no controle do biofilme presente em próteses totais”, sob responsabilidade da cirurgiã-dentista Janaina Habib Jorge e de sua orientada, o cirurgião-dentista Camilla Olga Tasso, que realizará a pesquisa. Declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1- Fui esclarecido que esse estudo tem por objetivo avaliar os efeitos de métodos de desinfecção das próteses na tentativa de eliminar alguns fungos que estão presentes nas mesmas. Para tanto, serei submetido a um exame clínico que possibilitará constatar se possuo algum problema na mucosa para saber se poderei participar da pesquisa.
- 2- Fui devidamente esclarecido sobre por que e como a minha prótese será avaliada e submetida ao processo de desinfecção. Minha prótese permanecerá em solução desinfetante por apenas 20 minutos. Após a coleta da placa bacteriana, a prótese será higienizada pelo método de escovação com sabão líquido neutro para depois ser entregue de volta para mim.
- 3- Estou ciente de que, se algum problema for detectado, serei encaminhado para tratamentos nas diferentes clínicas especializadas da Faculdade de Odontologia de Araraquara.
- 4- Estou ciente também que os fungos presentes na minha prótese serão coletados e que serão utilizados apenas para esse estudo.
- 5- Fui esclarecido que os pacientes participantes desta pesquisa não serão prejudicados em nenhum momento com relação ao processo de desinfecção das próteses. A desinfecção não causará alteração de cor ou gosto ruim nas próteses.
- 6- Estou ciente de que, durante os exames da minha boca, o dentista estará protegido por meio da utilização de luvas descartáveis, máscara, gorro e óculos, e todo o instrumental clínico será esterilizado em vapor.
- 7- Estou ciente que serei esclarecido sobre quaisquer dúvidas relacionadas à metodologia e que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.

9. Estou ciente que os riscos da pesquisa serão mínimos, uma vez que a coleta da placa bacteriana será realizada apenas nas próteses. Após a desinfecção das próteses, para minimizar o risco de componente residual, após a coleta, as próteses serão higienizadas pelo método de escovação com sabão líquido neutro. Também estou ciente de que a presente pesquisa trará informações sobre a eficácia de sabonetes líquidos desinfetantes no controle da placa de próteses totais, colaborando para a determinação de um protocolo de desinfecção de baixo custo.

10. Fui esclarecido de que não terei nenhum custo para participar da pesquisa e estou ciente que terei direito ao ressarcimento de gastos quando solicitado.

11. Caso haja qualquer problema com minha prótese durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contatar o pesquisador responsável, Janaina Habib Jorge, pelo telefone 3301-6550.

12. Além disso, estou ciente que possuo plena liberdade de consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação adicional em relação à pesquisa da qual participo, pelo telefone 3301-6432.

13. Fui informado de que receberei uma via datada e assinada desse documento.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, de de 20...

Assinatura do paciente

Pesquisadora responsável

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 01 de março de 2019.

Camilla Olga Tasso