



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



PAULA MASETTI

**Biocompatibilidade de resinas acrílicas para base e
reembasamento de próteses após períodos de imersão em
soluções desinfetantes: análise do metabolismo celular**

Araraquara

2016



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



PAULA MASETTI

**Biocompatibilidade de resinas acrílicas para base e
reembasamento de próteses após períodos de imersão em
soluções desinfetantes: análise do metabolismo celular**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral – área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a Dr^a Janaina Habib Jorge

Araraquara

2016

Masetti, Paula

Biocompatibilidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses após períodos de imersão em soluções desinfetantes: análise do metabolismo celular / Paula Masetti.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

83 f.; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra Janaina Habib Jorge

1. Biocompatibilidade 2. Resinas acrílicas 3. Citotoxicidade I.

Título

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

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

PAULA MASETTI

**Biocompatibilidade de resinas acrílicas para base e
reembasamento de próteses após períodos de imersão em
soluções desinfetantes: análise do metabolismo celular**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Prof^a Dr^a Janaina Habib Jorge

2º Examinador: Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero Vizoto

3º Examinador: Prof^a Dr^a Claudia Helena Lovato da Silva

Araraquara, 05 de abril de 2016

Dados Curriculares

Paula Masetti

NASCIMENTO	11/01/1989 - São Paulo, SP
FILIAÇÃO	Paolo Masetti Beatriz de Jesus Pinto Masetti
2009 a 2013	Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2011 a 2013	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Métodos Diagnósticos e Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2014 a 2015	Estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível I e II da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2014 a 2015	Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que lutam diariamente ao meu lado, transmitindo fé, amor, alegria, determinação, paciência e coragem, tornando os meus dias mais felizes.

Aos meus pais, **Paolo** e **Beatriz**, por todo amor, carinho, confiança, cuidado e força que vocês me dão até hoje, minha admiração por vocês é enorme, amo muito vocês! Muito obrigada por todos esses anos acreditar que eu podia ir mais além, obrigada por sonharem junto comigo e me incentivarem sempre a seguir essa carreira, vocês são e sempre serão a base de tudo, se hoje eu cheguei até aqui, foi por causa de vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao todo criador, Deus, que está acima de todas as coisas deste mundo, concebendo sempre os nossos desejos e vontades, mesmo quando de forma oculta.

Aos meus pais, **Paolo** e **Beatriz**, pela confiança, amor, cuidado e sabedoria, agradeço por tudo que eles têm me proporcionado, nunca deixando faltar nada. Meu maior sonho é que vocês fossem eternos.

Agradeço também a minha irmã, **Pamela**, que mesmo longe, sempre esteve tão perto.

Agradeço minha família, desde os que moram em São Paulo até os em Aracajú, são a base de tudo.

Agradeço principalmente à Prof^a Dr^a **Janaina Habib Jorge**, por todos os momentos de empenho e colaboração, por toda confiança depositada em mim, por acreditar no meu potencial, pela oportunidade de ter cursado o mestrado sob a sua orientação, por estimular a superar minhas dificuldades e pela amizade e sincera preocupação.

A todos os amigos que eu fiz aqui em Araraquara, desde dos porteiros do meu prédio até os amigos mais próximos, vocês foram essenciais nessa jornada, obrigada!

Agradeço especialmente à turma 84 da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por todas as nossas conquistas, tudo o que passamos juntos (provas, seminários, festas) serão inesquecíveis, obrigada por serem uma turma tão unida. Nunca vou esquecer um segundo do que passamos.

Às minhas amigas e companheiras de mestrado, **Maria Isabel**, **Cláudia**, **Jacqueline**, pessoas antes desconhecidas e tão diferentes de mim,

que me fizeram ver a vida com outros olhos, obrigada pela amizade e pelas risadas!

A todos os docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral que, de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e formação.

Aos amigos de Laboratório de Cultura de Células e Engenharia de Tecidos e Microbiologia Aplicada, **Paula Barbugli, Denise Souza, Beatriz Panariello, Chaiene, Camila Foggi, Juliana Cabrini, Fernanda Alves, Jefferson, Maria Isabel, Kássia, Cláudia, Érica, Sarah, Geisiane**, muito obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pela amizade e trocas de experiências.

Aos coordenadores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial, aos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pessoas muito prestativas e queridas.

Aos funcionários da secretária de Pós-Graduação, pela presteza e eficiência dos serviços prestados durante todo o curso.

A **CAPES** pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro que propiciou o bom andamento da pesquisa.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho e que não estão citadas nominalmente, meus sinceros agradecimentos.

“Só é digno da liberdade, como da vida,
aquele que se empenha em conquistá-la.”

Johann Goethe

Masetti P. Biocompatibilidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses após períodos de imersão em soluções desinfetantes: análise do metabolismo celular [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito cumulativo das soluções desinfetantes na citotoxicidade de resinas acrílicas para base (Vipi Wave) e reembasamento (Tokuyama Rebase II) de próteses. Corpos de prova com 14 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura foram distribuídos em grupos (n=3) de acordo com o tipo de solução: água destilada, digluconato de clorexidina a 2%, perborato de sódio a 3,8%, hipoclorito de sódio a 0,5% e vinagre de maçã, e de acordo com o tempo de imersão: 0, 1, 3 e 6 meses. Os corpos de prova, tanto de base quanto de reembasamento, ficaram 8 horas imersos nas soluções e 16 horas em água destilada, simulando desinfecção noturna das próteses. As soluções foram trocadas diariamente. Após os diferentes períodos de imersão, as amostras foram colocadas em meio de cultura por 24 horas para obtenção de extratos para análise da citotoxicidade sobre queratinócitos humanos (HaCaT: 0341). O metabolismo celular foi avaliado pelo teste Alamar Blue[®]. Empregou-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com significância de 5%. Os resultados demonstraram que o tipo de resina não teve influência sobre o metabolismo celular. Além disso, a imersão das amostras de resina acrílica 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. Os extratos obtidos a

partir da imersão das amostras em digluconato de clorexidina a 2% ou em vinagre de maçã durante 3 e 6 meses foram considerados intensamente citotóxicos. Pôde-se concluir que o digluconato de clorexidina a 2% e o vinagre de maçã aumentaram citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Resinas acrílicas. Biocompatibilidade.

Masetti P. Biocompatibility of denture base and reline acrylic resins after immersion in disinfectant solutions periods: cellular metabolism analysis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the cumulative effect of disinfectant solutions in cytotoxicity base acrylic resins (Vipi Wave) and reline (Tokuyama Rebase II) of dentures. Samples of 14 mm diameter and 1.2 mm thick were distributed in groups (n = 3) according to the type of disinfectant solution: distilled water, 2% chlorhexidine digluconate, 3.8 % sodium perborate, 0.5% sodium hypochlorite and apple vinegar and in accordance with the immersion time: 0, 1, 3 and 6 months. The samples of both base and of reline, eight hours were immersed in solutions and 16 hours in distilled water, simulating night disinfection of prostheses. The solutions were changed daily. After different periods of immersion, the samples were placed in culture medium for 24 hours to obtain extracts for analysis of cytotoxicity on human keratinocyte (HaCaT: 0341). The cellular metabolism was assessed by Alamar Blue ® test. It used analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, with 5% significance. The results demonstrated that the resin type had no influence on cellular metabolism. Furthermore, the immersion of the samples in acrylic resin base and reline dentures in distilled water, 3.8% sodium perborate and 0.5% sodium hypochlorite did not influence the cellular metabolism of keratinocytes, regardless of the time of immersion. The extracts obtained from immersing the samples 2% chlorhexidine digluconate or apple vinegar for 3 and 6 months were considered

strongly cytotoxic. It was concluded that chlorhexidine digluconate 2% and apple vinegar increased cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins.

Keywords: Cytotoxicity. Acrylic resin. Biocompatibility.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	PROPOSIÇÃO	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
4	MATERIAL E MÉTODO	45
5	RESULTADO	60
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da longevidade, é cada vez maior a população idosa em todo o mundo. No Brasil, a principal característica do crescimento do grupo populacional com mais de 65 anos é a rapidez com que o mesmo se processa⁶². Esta faixa etária de pacientes geralmente apresenta peculiaridades que envolvem uma atenção especial para sua condição de saúde geral e bucal. Com o aumento da vida média, o conceito de qualidade de vida torna-se mais importante e a saúde bucal tem papel relevante para o idoso, uma vez que o comprometimento da saúde bucal pode afetar negativamente seu bem-estar físico, mental e social⁶³.

Uma das lesões mais prevalentes em portadores de próteses removíveis parciais ou totais é a estomatite protética³⁹. Tal doença caracteriza-se por eritema difuso, que pode ter aspecto homogêneo ou de pontos ou áreas focais avermelhados, além de apresentar variadas alterações na textura e superfície da mucosa palatina¹⁷.

A etiologia da estomatite protética mostra-se extremamente variável, sendo considerada multifatorial^{15,11}. A combinação entre fatores sistêmicos como deficiências nutricionais, diabetes, xerostomia, imunossupressão e fatores locais como trauma pela prótese, infecção por fungos e bactérias e higienização deficiente, podem predispor pacientes à estomatite protética²⁷.

A presença da prótese é o fator local iniciante para a doença, pois a superfície interna de resina apresenta irregularidades e microporosidades que facilitam a colonização de bactérias e fungos. Estes micro-organismos formam na superfície da prótese um biofilme semelhante ao biofilme dental, tanto na sua

composição, quanto no seu processo de colonização. Além disso, uma oclusão não balanceada pode causar trauma na mucosa palatina, expondo o tecido à infecção uma vez que aumenta a permeabilidade do epitélio à toxinas produzidas pelos micro-organismos³¹.

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos a determinadas próteses transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sendo assim, os cuidados de higiene são aspectos importantes na manutenção da saúde bucal dos usuários de próteses removíveis parciais ou totais⁵².

Diversos são os tratamentos propostos para a estomatite protética. O tratamento mais comumente recomendado tem sido a utilização de medicamentos antifúngicos, os quais podem ser de aplicação tópica ou sistêmica, orientação do paciente quanto à higienização da prótese e verificação da necessidade da troca da mesma⁵. Além disso, é consenso na literatura que a suspensão do uso noturno da prótese favorece a diminuição do componente inflamatório. Porém, o uso de drogas antifúngicas é limitado por inúmeros fatores, como resistência fúngica, baixa solubilidade e alta toxicidade. Sendo assim, a prevenção é considerada a medida mais eficaz a ser assumida contra os problemas relacionados ao uso de próteses removíveis⁶⁹.

Dentre os métodos de prevenção, a limpeza das próteses é fator essencial. A higienização pode ser realizada mecanicamente, quimicamente ou pela combinação de ambas⁷⁹. O procedimento mecânico de remoção do biofilme nas superfícies das próteses mais utilizado pelos pacientes é a escovação com sabão ou dentífrico⁶⁶. A remoção efetiva do biofilme pelo método da escovação é considerada duvidosa, uma vez que a superfície das bases das próteses são

irregulares e porosas. Além disso, certo grau de destreza manual é requerido, o que quase sempre é limitado em pacientes idosos⁶⁵. Dessa forma, a limpeza química, como a imersão das próteses em soluções desinfetantes, deveria também ser realizada⁷⁰.

Vários são os agentes químicos de limpeza utilizados para a desinfecção ou redução do biofilme das próteses. O hipoclorito de sódio a 0,5% pode ser útil para a desinfecção das próteses, uma vez que inativa o biofilme bacteriano, inibe a formação de cálculo e ajuda no desaparecimento de manchas²⁸. Já o digluconato de clorexidina a 2%, além de inativar o biofilme (efeito bactericida e fungicida), reduz a capacidade de adesão dos micro-organismos, sendo considerado efetivo na desinfecção de próteses¹⁰. O perborato de sódio a 3,8% tem propriedades antissépticas¹¹⁰, interfere no metabolismo dos micro-organismo e liberam agentes oxidantes que ajudam a remover manchas⁶⁰. O vinagre de maçã, é considerado um dos primeiros remédios da humanidade⁷ e funciona como um adstringente⁸⁴.

Estudos têm mostrado que as próteses removíveis, em contato com a mucosa, pode atuar como irritante ou causador de reações alérgicas. Os sinais e sintomas clínicos mais frequentes são vermelhidão, erosão na mucosa oral, queimação na mucosa e na língua⁹⁴. Histologicamente, podemos observar infiltrado inflamatório e aumento da camada de queratina nas áreas da mucosa em contato com a prótese⁹⁶. As resinas acrílicas têm apresentado diferentes graus de citotoxicidade in vitro e de respostas alérgicas in vivo, provavelmente em função de componentes que não reagiram durante o processo de polimerização ou pela reação dos seus subprodutos⁹⁹. Estudos têm demonstrado que as substâncias potencialmente tóxicas originadas de resinas de base incluem metil metacrilato,

formaldeído, ácido metacrílico e ácido benzoico⁴⁹. Lefebvre et al.⁵⁵ 1994, verificaram que o formaldeído apresentou efeito citotóxico em concentrações menores do que o metil metacrilato. Esses componentes tóxicos, difundidos em meio aquoso, podem ser capazes de agir inclusive em locais distantes da área de contato da resina. Dessa forma, áreas extensas de mucosa podem ficar expostas a componentes tóxicos por longo período de tempo⁴⁶. As resinas acrílicas atuais também contêm aditivos que não têm sido amplamente estudados, portanto são prováveis responsáveis por reações de hipersensibilidade⁴⁷.

Além dos componentes liberados pelas resinas, comprovadamente citotóxicos, substâncias como os agentes de limpeza e soluções desinfetantes podem ser incorporados e liberados em meio bucal, podendo também causar irritação ou reação alérgica na fibromucosa dos usuários de próteses. A citotoxicidade das soluções desinfetantes tem sido investigada⁵⁶. Porém, a possibilidade dessas soluções serem incorporadas pelas resinas de base ou reembasadores e liberadas no meio bucal dos usuários de próteses ainda não foi explorada, justificando a proposta do presente estudo.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito cumulativo de soluções desinfetantes na citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses. A hipótese avaliada foi de que o uso de diferentes soluções desinfetantes, por período de 6 meses, poderia aumentar a citotoxicidade das resinas acrílicas para bases e reembasamento de prótese.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Com o objetivo de facilitar a compreensão, o capítulo “Revisão da Literatura” apresentará os trabalhos revistos divididos em tópicos: estomatite protética, métodos de desinfecção e agentes desinfetantes e citotoxicidade.

3.1 Estomatite Protética

A literatura reporta uma grande variedade de terminologias para se referir a esta doença: estomatite por prótese total ou estomatite protética, candidíase eritematosa, boca irritada por dentadura, estomatite por dentadura associada à *Candida*, estomatite induzida por dentadura, Candidíase Oral associada ao uso de dentadura, Candidíase Atrófica Crônica e estomatite relacionada à dentadura. A mucosa bucal é vulnerável ao surgimento de várias lesões devido ao uso de próteses mucossuportadas, entretanto, a estomatite protética é relatada como sendo uma das mais prevalentes²³. Neville et al.⁶⁸, em 2001, descreveram essa lesão como um eritema inflamatório multifocal ou generalizado em toda a mucosa que está em contato com a porção interna da prótese, evidenciando o delineamento do aparelho protético. Pode apresentar-se assintomática, fazendo com que a lesão não seja perceptível ao portador.

Oliveira et al.⁷⁵, em 2000, descreveram a estomatite protética como uma lesão com aspectos eritematosos difusos ou pontilhados na mucosa em contato com a prótese. Sua etiologia é controversa, podendo estar relacionada principalmente a fatores locais. Diversos aspectos funcionais associam-se a estes fatores representados pela oclusão, dimensão vertical, retenção, estabilidade dinâmica e estática além de aspectos qualitativos, relacionados às condições encontradas nos desdentados. Segundo os autores, os

procedimentos de inclusão, preparo e polimento da resina devem ser realizados em sequência, obedecendo à orientação do fabricante para obtenção de resultado melhor. Proporção incorreta seja do monômero ou do polímero, assim como tempo e temperatura inadequada durante o ciclo de polimerização também podem trazer alterações aos tecidos de suporte da prótese total. Jean et al.⁴⁵, em 2003, caracterizaram a estomatite protética como um processo inflamatório que envolve principalmente a mucosa do palato quando está coberta total ou parcialmente pela dentadura. Para os autores sua etiologia é multiparamétrica: a idade avançada e o declínio concomitante do sistema imune de defesa, doenças sistêmicas, fumo, uso da dentadura ao dormir e pobre higiene bucal resultando em acúmulo de biofilme na prótese. Existe a possibilidade de que a colonização da dentadura e da mucosa bucal pela *C. albicans* possa ocorrer secundariamente ao processo inflamatório.

Feltrim³⁰, em 1989, analisou a superfície interna de próteses totais mucossuportadas, buscando esclarecimentos sobre a etiologia da estomatite protética. Cada prótese foi analisada no seu aspecto microanatômico, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, e a mucosa foi examinada com o auxílio da microscopia de luz ao nível citológico, histopatológico e imunohistoquímico. A metodologia empregada possibilitou sugerir que a estomatite por próteses é decorrente de traumatismos causados pela prótese sobre a mucosa, associado a fatores irritantes, provocando uma placa bacteriana presente em sua superfície.

De acordo com Budtz-Jorgensen¹², Newton¹⁵, em 1962, classificou a estomatite protética em três tipos: tipo 1) - apresenta inflamação localizada; tipo 2) - apresenta um eritema difuso e o tipo 3) - apresenta hiperplasia papilar

inflamatória, frequentemente, pode estar associada a queilite e a glossite. As principais causas da estomatite protética são traumas e infecções por espécies de cândida, principalmente *Candida albicans* que é considerado o único micro-organismo com função patogênica estabelecida na estomatite protética. Não existem evidências científicas que comprovem que a alergia a base do material protético, em particular a resina acrílica, seja mais uma complicação secundária ao uso da prótese. Sabe-se que a estomatite tipo 1 é causada apenas por trauma, enquanto que as do tipo 2 e 3 são induzidas por cândida; no entanto, o trauma pode ser um fator desencadeante à infecção. No estudo de Budtz-Jorgensen¹³, em 1981, foi observado que a *Candida albicans* é um fungo dimórfico, que pode se apresentar sob a forma de levedura (inócua) ou hifa (patogênica). No que tange aos portadores de prótese, observa-se uma grande ocorrência dessa patologia nestes indivíduos, recebendo nestes casos, a denominação de estomatite causada por dentadura.

Pereira-Cenci et al.⁷⁷, em 2007, salientaram a importância do controle efetivo do biofilme com uma higienização eficiente da prótese, pois a aderência dos micro-organismos e resíduos é favorecida pelas superfícies rugosas e irregulares. Jagger et al.⁴³, em 2002, afirmam que superfícies irregulares e rugosas reduzem as atividades dos produtos de limpeza. Assim, parece lógico afirmar que a rugosidade superficial é extremamente crítica às próteses totais, chamando atenção ainda para o fato de que a superfície externa vestibular ou lingual da prótese são as regiões que devem ser polidas, porém a superfície interna ou área basal convencionalmente não sofre processos de acabamento e polimento. Sendo assim, essa região deve apresentar coeficiente de rugosidade bem superior a 0,2 micrômetros, tornando-se passível de adesão microbiana.

Como agravante, a abrasão provocada pela higienização através da escova dental, os ajustes clínicos periódicos com fresas e a deterioração do acrílico por substâncias como água e agentes de desinfecção, são fatores que proporcionam a formação de irregularidades na resina, favorecendo o acúmulo de patógenos no interior da prótese, podendo estes chegar a penetrar até 3 milímetros na estrutura (Silva et al.⁹², 2009).

Van-Reenen¹⁰¹, em 1973 e Webb et al.¹⁰⁶, em 1998, afirmaram que na terapêutica da estomatite por prótese total, é inútil apenas a eliminação de seus patógenos presentes na cavidade bucal através de antifúngicos locais ou sistêmicos, se os tecidos bucais forem inoculados repetitivamente por uma prótese contaminada. Sabendo que a estomatite por prótese está associada ao crescimento de *Candida* no biofilme sobre a prótese, e não na mucosa do palato, o tratamento deve ser direcionado também a prótese e não somente à mucosa. Deste modo, passam a ter maior relevância os cuidados de higienização realizados sobre a superfície protética.

Lemos et al.⁵⁷, em 2003, relataram no seu estudo que a *Candida albicans* tem grande influência no desenvolvimento da estomatite protética, uma vez que, pode iniciar, manter ou ainda exacerbar tal lesão e frequentemente está associada a um fator iatrogênico, podendo ser a má-adaptação, desgaste pelo uso ou principalmente a higienização precária das próteses. Os autores ressaltaram ainda que a etiologia da estomatite protética é multifatorial, podendo ser de origem alérgica ao monômero residual constituinte do aparelho protético, presença do biofilme, trauma, uso contínuo, hipossalivação e a associação com o fungo *Candida albicans*.

Arendorf⁹, em 1997, descreveu que o tratamento para a estomatite protética associada à candidíase consiste na combinação de antifúngico tópico, orientação do paciente quanto à higienização da prótese e verificação da necessidade de substituição da mesma. É importante ressaltar que a confecção de próteses novas, corretamente acrilizadas e ajustadas, controles periódicos, métodos eficientes de desinfecção e remoção noturna da prótese fazem parte de um conjunto de medidas visando um tratamento preventivo. Quando a doença já está instalada, um tratamento curativo deve ser instituído, incluindo, avaliação e tratamento de doenças sistêmicas que debilitam o sistema imunológico e uso de antifúngicos para eliminação da infecção dos tecidos (Turano et al.¹⁰⁰, 2002).

3.2 Métodos de Desinfecção

3.2.1 Métodos mecânicos

A prótese dentária tem a função de restabelecer função e estética ao paciente, desde que o cirurgião-dentista siga corretamente todas as etapas na confecção da mesma e que, após a sua entrega, o paciente dispense certos cuidados. Esses cuidados são muito importantes, pois o tratamento de reabilitação oral não significa apenas a instalação da prótese na boca do paciente. Também faz parte do tratamento a orientação e a motivação quanto à higienização da mesma e dos tecidos da cavidade bucal (Carvalho et al.¹⁴, 2003). Andruccioli et al.⁸, em 2004 afirmaram que pesquisas revelam que a maioria da população usuária de próteses dentárias tem falhado na manutenção da limpeza de suas próteses. De acordo com Goiato et al.³⁶, em 2005, após a instalação das próteses, deve-se realizar acompanhamento periódico para a orientação aos usuários sobre a higienização e o uso. A falta desse acompanhamento do

cirurgião-dentista tem levado aos pacientes de próteses removíveis a acreditar que os desconfortos que as mesmas provocam fazem parte do processo de adaptação e que, só após a sua completa degradação, é que devem ser substituídas. Em estudo realizado por Kulak-Ozkan et al.⁵³, em 2002, quase metade (48,6%) dos indivíduos (n=70) da pesquisa apresentaram próteses com higiene deficiente. Em relação à frequência de limpeza, 54,3% dos indivíduos higienizavam a prótese uma vez ao dia, ou menos de uma vez ao dia. Em relação ao método de higiene, 57,1% apenas fazia uso de escovação, 8,6% associavam escovação com produtos de imersão, e 11,5% não faziam uso de nenhum método.

Kazuo et al.⁵⁰, em 2008, relataram que para uma limpeza efetiva da prótese há, no mercado atual, vários mecanismos e meios para a remoção de manchas, biofilme e cálculo, porém muitos estudos mostram que um grande número de usuários de prótese não sabem higienizá-la satisfatoriamente, por não terem sido orientados pelos cirurgiões dentistas ou por não seguirem as recomendações. Quando não bem higienizada, a prótese dentária se torna em uma importante fonte de infecção para o paciente. Além disso, geralmente, os portadores de próteses totais são idosos, e sendo assim, muitos apresentam comprometimentos sistêmicos, que os tornam mais suscetíveis às infecções; e, às vezes, também possuem dificuldades motoras, que comprometem a higienização da prótese. Aliado a esses fatores, Andruccioli et al.⁸, em 2004, relataram que as resinas acrílicas quando colocadas na cavidade oral adsorvem e absorvem fluidos orais e se tornam contaminadas com diferentes micro-organismos. Desta forma, os usuários de prótese têm uma alta incidência de

estreptococos do grupo mutans, leveduras, estafilococos e lactobacilos em sua cavidade oral.

A correta higienização oral e do aparelho protético, junto com o planejamento cuidadoso da prótese parcial removível, assim como consultas periódicas, promovem uma maior longevidade do tratamento protético realizado. O acúmulo de biofilme bacteriano sobre a resina que forma a base da prótese pode levar, como consequência, à hiperplasia papilar inflamatória, estomatite protética e a candidíase crônica. No tratamento destas patologias, indica-se a limpeza e desinfecção da prótese, bem como orientação quanto a um método mais adequado de higienização da prótese. Considerando as dificuldades de higienização da prótese dentária, em razão de suas características anatômicas, bem como das microporosidades inerentes às resinas acrílicas, fica evidente que é imprescindível a limpeza diária e adequada das próteses para manutenção da saúde oral. Torna-se prioritário e essencial que o dentista oriente, ou melhor, conscientize seus pacientes da necessidade de higienizar a mucosa e a prótese adequadamente, para a preservação da saúde oral e sistêmica dos mesmos, e para a manutenção de suas próteses (Catão et al.¹⁶, 2007).

A higiene oral e a higiene da prótese são essenciais para manter a saúde dos tecidos, prevenindo o desenvolvimento das patologias, e consequentemente aumentando a longevidade de uma reabilitação oral com próteses removíveis (Fonseca et al.³³, 2007). Fatores como higienização deficiente, irregularidades presentes na superfície das próteses, comportamento dos materiais diante a temperatura bucal, e a pressão negativa existente na interface resina acrílica – mucosa, levam ao acúmulo de debris que facilitam a formação do biofilme na superfície das próteses. Esse biofilme permite a ação

dos micro-organismos na mucosa adjacente, o que resulta em diversas patologias. Entre as mais comuns destaca-se a estomatite protética (Silva et al.⁹³, 2008).

A aderência de micro-organismos é também favorecida pela topografia áspera e irregular da superfície de resina metacrilato (Cheng et al.¹⁹, 2008). Tais irregularidades fornecem um aumento na área de superfície e na expansão do número de nichos não limpos pela ação da língua ou musculatura orofacial. Apesar da aparência lisa da superfície, essas resinas mostram uma superfície irregular, quando observadas ao microscópio. Isto decorre da formação de bolhas de monômeros não polimerizados durante o processamento da dentadura. Para Goiato et al.³⁶, em 2005, não é incomum encontrarmos lesões orais decorrentes do uso de próteses iatrogênicas ou até mesmo de uma inadequada orientação do paciente pelo cirurgião dentista quanto ao uso e higienização destas próteses. Dentre estas lesões destacam-se hiperplasias, estomatites, úlceras traumáticas, lesões periodontais e as candidíases. Almeida et al.⁴, em 2006, em seu estudo, relataram que além de alterações patológicas, o acúmulo de detritos alimentares e biofilme sobre a superfície da prótese também pode resultar em problemas como halitose, cálculo salivar e pigmentações. Por conta disso, a higienização das próteses e a remoção do biofilme são passos importantes para a manutenção da saúde bucal.

De acordo com Catão et al.¹⁶, em 2007, o biofilme presente nas próteses pode ser controlado por métodos mecânicos, químicos e mecânico-químicos de higienização. Recomenda-se a utilização conjunta dos métodos mecânico e químico de higienização, a fim de obter um controle adequado do biofilme nos aparelhos protéticos. Neste método observa-se a combinação da

escova e dentifrício seguido da imersão da prótese em soluções químicas. O método mecânico baseia-se na utilização da escova dental, dentifrício e sabão neutro, onde o paciente deverá ter uma escova para a cavidade bucal e outra para a prótese. O método químico é realizado por meio da imersão da prótese em produtos químicos que possuem ação solvente, detergente, fungicida e bactericida. Dentre os agentes químicos destacam-se os hipocloritos, peróxidos alcalinos, ácidos diluídos, enzimas e clorexidina. Idealmente os limpadores de prótese devem ser de fácil manuseio, baixo custo para incentivar seu uso, terem gosto agradável após o uso, não serem tóxicos ao paciente, serem compatíveis com todos os materiais da prótese, efetivos na remoção de manchas, depósitos orgânicos e inorgânicos não apenas das superfícies polidas, mas, principalmente, das superfícies rugosas que ficam em contato com os tecidos (Silva et al.⁹⁰, 2002). Além disso, para Kazuo et al.⁵⁰, em 2008, os agentes químicos devem possuir ação bactericida e fungicida, apresentar compatibilidade com a resina acrílica e não devem promover corrosão ao metal, quando presente, na prótese.

O método mecânico mais utilizado para higienização da prótese é a escovação com água e sabão ou dentifrício (Silva et al.⁹³, 2008). Quando bem realizada, esta técnica tem demonstrado remoção de manchas artificiais. Na escovação deve-se utilizar escova apropriada e uma pasta pouco abrasiva, a fim de se evitar desgaste na resina acrílica. O uso de uma técnica de escovação inadequada associada a produtos altamente abrasivos, leva ao desgaste das próteses, facilitando ainda mais o acúmulo de biofilme, além de promover desadaptação do aparelho protético. Da mesma forma, Silva⁸⁹, em 2002 e Paranhos⁹⁰, em 2006, relataram que um dos métodos mais usuais de limpeza

de próteses dentárias é a associação entre escovação e o uso de dentifrícios. Esse é o método mais comumente utilizado pelos pacientes e o mais recomendado pelos cirurgiões dentistas, por ser simples de usar, ser de fácil acesso e de baixo custo.

Para Freitas-Pontes et al.³⁴, em 2009, a maior desvantagem nesta remoção mecânica do biofilme é a ação abrasiva sobre os materiais componentes da prótese. Esta abrasão pode resultar em perda de material, de rugosidade, e de brilho, além de gerar problemas de adaptação da própria prótese. Assim, dentifrícios específicos, com fórmula sem partículas abrasivas causam menos danos à resina acrílica das próteses. A abrasão da superfície acrílica é um fator negativo dos dentifrícios comuns, que resulta no desgaste excessivo e deterioração do acrílico com o aparecimento de ranhuras que propiciam a agregação de resíduos e micro-organismos (Cheng et al.¹⁹, 2008). Para Paranhos⁷⁶, em 1996, uma escova apropriada para a higienização de próteses totais, caracteriza-se basicamente por uma escova de cabo menor (plano ou cilíndrico), tendo o conjunto de tufos de fibras seguindo a mesma direção do cabo e este tufo formando um cilindro de pequeno diâmetro terminando em cone. As fibras centrais do tufo devem ser mais longas que as demais, com aproximadamente 22 mm de comprimento. As fibras devem ser mais grossas, mais rígidas e mais longas que aquelas das escovas para dentes naturais. O modelo de escova com cabo cilíndrico, isto é, tubular e oco oferece várias vantagens: 1º) Permite uma limpeza adequada e completa de todas as zonas internas e externas da prótese total, devido ao fato de o cabo não ser perpendicular às fibras e não esbarrar contra as paredes ou bordas da prótese; de as fibras serem mais longas que as fibras de escovas para dentes naturais;

de o conjunto de tufos de fibras formarem uma espécie de cilindro e de as fibras centrais serem mais longas que as demais. 2º) Impede qualquer tipo de acidente, pois pode ser manuseada como um lápis ou como um pincel e fica sob completo domínio das mãos do paciente. 3º) Pode ser levada em qualquer lugar devido ao seu pequeno tamanho (quase metade das escovas para dentes naturais).

Em pesquisa realizada por Fernandes et al.³², em 2007, o uso de escova de dente convencional tem causado desgaste no material da prótese, não garantindo uma higienização adequada, uma vez que seu design não garante um total alcance nas superfícies interna e externa da prótese. Escovas e dentifrícios específicos para prótese não são comuns no Brasil, sendo frequente o uso de produtos originalmente destinados à higiene dentária. Tais produtos específicos não estão regularmente disponíveis para compra, e quando estão, ficam por um período de tempo curto. As escovas com formato anatômico desenvolvido para higiene de próteses removíveis possuem cerdas mais macias para não danificarem a superfície polida do aparelho. Estas cerdas são distribuídas nos dois lados da cabeça, sendo um tufo mais grosso para escovar a parte externa da prótese, e um mais comprido, para alcançar as partes mais profundas da região basal (Kazuo et al.⁵⁰, 2008). Para Wagner B. e Kern¹⁰⁵, em 2000, o uso de dentifrícios e de escovas convencionais, apesar de serem eficazes na remoção de resíduos alimentares e biofilme da resina da sela e dos dentes artificiais das próteses parciais removíveis, não promovem uma limpeza adequada na porção interna dos grampos e conectores menores. Esses componentes, por serem pequenos e apresentarem forma irregular, não permitem que escovas convencionais removam o biofilme que se adere em sua parte interna, sendo necessário escovas de formato cônico ou cilíndrico. Esse

método de limpeza, usado abusivamente e com uma técnica de escovação incorreta, pode causar danos ao material da prótese.

De acordo com Silva e Paranhos⁸⁹, em 2006 e Fernandes et al.³², em 2007, materiais específicos para higienização de prótese são facilmente encontrados em outros países, mas no mercado brasileiro só se encontra uma quantidade limitada de produtos. O resultado disso é que se usam escovas convencionais para higienização de próteses. Outro método mecânico disponível é a agitação ultra-sônica, que converte energia elétrica em mecânica com uma frequência de 20.000 ciclos/s, porém este tratamento por si só não é eficiente na remoção do biofilme. Sua eficácia é observada quando associado a soluções desinfetantes, em que não há desgaste da superfície polida da prótese (Fonseca et al.⁵¹, 2007). Deve ser indicado para pacientes com destreza manual prejudicada, idosos que apresentam dificuldade visual e motora, além de seu uso em consultórios. Esse método é fácil e rápido na limpeza da prótese, porém pouco usado, provavelmente devido ao custo do aparelho (Kazuo et al.⁵⁰, 2008).

3.2.2 Métodos químicos

Dentre os métodos químicos, os peróxidos alcalinos são os agentes mais comercializados para higienização de próteses (Macêdo e Barra⁶¹, 2002). São disponíveis em forma de pó ou tabletes que se transformam em soluções alcalinas de peróxido de hidrogênio quando dissolvidos em água. Os peróxidos não possuem o pH tão baixo quanto os ácidos e nem a alcalinidade dos hipocloritos. Eles são uma combinação química complexa de ingredientes ativos designados para atacar primariamente os constituintes orgânicos dos depósitos nas próteses. Geralmente estes produtos combinam detergentes alcalinos, como

o fosfato trissódico para reduzir a tensão superficial, e agentes liberadores de oxigênio, como o perbonato ou o perborato de sódio. Para Nogaroto e Penna⁷¹, em 2006, a efervescência criada pela liberação de oxigênio realiza uma limpeza mecânica na prótese, a presença de agentes oxidantes ajuda a remover manchas e possuem ação antimicrobiana. Podem ser utilizados tanto em próteses totais quanto em próteses parciais removíveis metálicas, pois não causam danos ao metal nem à resina acrílica do aparelho. Quando utilizados regularmente, desde o início de uso da prótese, parecem ser mais efetivos sobre o biofilme, manchas e cálculos dentais recém-formados quando a prótese é imersa por várias horas ou por toda a noite, pois estes produtos não são efetivos quando utilizados num período de 15 a 30 minutos (Silva et al.⁹³, 2008).

No estudo do Kazuo et al.⁵⁰, 2008, os autores observaram que os peróxidos alcalinos são eficazes na remoção de manchas, entretanto não são mais eficientes que a escovação com sabão. Se usados rotineiramente, estes produtos poderão causar o clareamento da resina acrílica. O branqueamento do acrílico da prótese quando tratada diariamente com o peróxido pode ser devido à falha na polimerização ou na exposição de algum solvente. Além disso, para Andrade et al.⁶, 2007, o enxágue incorreto dos peróxidos alcalinos, deixa resíduos do produto que provocará lesões nos tecidos da cavidade bucal. Materiais para reembasamento macios ou resilientes são muito susceptíveis aos efeitos nocivos desses agentes de limpeza. A vantagem deste produto é que ele não causa efeito deletério à resina ou ao metal da prótese (Sesma et al.⁸⁵, 2005). No estudo de Catão et al.¹⁶, em 2007, observou-se que o perborato de sódio obteve um resultado aceitável quanto a redução do biofilme presente nas próteses, uma vez que reduziu cerca de 50% do mesmo, em 60% da amostra.

Os hipocloritos alcalinos são muito utilizados para higienização de próteses, pois possuem ação adstringente ao dissolver mucinas e outras substâncias orgânicas da matriz do biofilme, inibindo a formação e reposição de cálculos. Os hipocloritos são também bactericidas e fungicidas, eliminando micro-organismos tanto em superfície como em profundidade, sendo eficazes contra esporos e vírus da hepatite B (Catão et al.¹⁶, 2007). Por Abere², em 1979, a utilização de hipoclorito de sódio foi introduzida em 1835 como antisséptico, sendo a primeira solução química usada rotineiramente para a imersão de próteses. O hipoclorito de sódio, no estudo de Concil²², em 1983, foi apresentado na forma de solução, o qual dissolve mucinas e outras substâncias orgânicas. Foi eficiente na eliminação do biofilme, remoção de manchas e na inibição da formação de cálculos, possui a capacidade de eliminar bactérias tanto em superfície, como em profundidade, apresentando assim, efeito bactericida e fungicida. O 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%. O tempo de imersão varia de acordo com a concentração utilizada. Para Jagger e Harrison⁴⁴, em 1995, a concentração indicada da solução de hipoclorito de sódio é de 0,525% com imersão de 10 min para uma eficaz desinfecção da superfície protética, seguido de enxague e imersão em água por toda a noite para minimizar o potencial de dano ao metal de próteses parciais removíveis. Eles alertam também para o inconveniente de deixar sabor desagradável e odor residual. Afirmam ainda que o método é simples e facilmente executado por pessoas que apresentam dificuldades motoras e que não se adaptam à escovação. Porém, como desvantagens principais, citam a possibilidade de clareamento dos materiais de

confeção das próteses, a corrosão dos componentes metálicos, como estruturas de cobalto-cromo para próteses parciais removíveis, odor desagradável e o alto custo do produto no mercado. A recomendação clínica do uso de alvejantes domésticos para a higienização e esterilização de próteses é comum. De acordo com Chau¹⁸, em 1995, a solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, com tempo de imersão de dez minutos, permite desinfecção da superfície e também penetra 3 milímetros na resina, eliminando bactérias em profundidade. Outra desvantagem do hipoclorito é que pode provocar clareamento da resina acrílica, dependendo de sua concentração e tempo de imersão, ou corrosão, em casos de próteses parciais removíveis constituídas de cromo-cobalto ou aço inoxidável (Silva et al.⁹³, 2008). Dessa forma, o uso do hipoclorito em longo prazo é contra-indicado para a limpeza de próteses parciais removíveis (Kazuo et al.⁵⁰, 2008). Para utilizar o hipoclorito de sódio, de forma esporádica, é recomendado que a prótese de resina acrílica seja imersa numa solução de 15 mL de hipoclorito de sódio com concentração de 2-3% (água sanitária convencional) diluídos em 300 ml de água durante, no máximo, 15 a 20 minutos diários. No caso de próteses parciais removíveis metálicas, esse período não pode exceder 10 minutos. Decorrido esse tempo, as próteses totais e parciais devem ser enxaguadas e imersas em água fria durante toda a noite a fim de tirar o gosto e odor desagradáveis, além de minimizar os efeitos lesivos ao metal.

No estudo de Catão et al.¹⁶, 2007, foi avaliado a limpeza de próteses submetidas a três diferentes substâncias, hipoclorito de sódio a 2,25%, perborato de sódio e clorexidina. A que obteve maior eficiência na remoção do biofilme foi o hipoclorito de sódio a 2,25%, mostrando uma diminuição significativa de colônias de *S. mutans* e *C. albicans*, o que confirma sua ação antimicrobiana.

Os autores, Vianna ME et al.¹⁰³, em 2004 e Okino LA et al.⁷³, em 2004, também chamam a atenção para o fato de que existem divergências na literatura em relação às concentrações e tempo de exposição. Saliendam ainda a necessidade da realização de novos estudos para melhores esclarecimentos, uma vez que a solução de hipoclorito de sódio pode causar o clareamento de resina acrílica se usado por tempo e ou concentração inadequados (Davi LR et al.²⁵, em 2010).

Para Abelson¹, em 1985, outros grupos de agentes desinfetantes podem ser constituído pelos seguintes produtos: gluconato de clorexidina, salicilato, etanol, formalina, ácido acético e clorofórmio. A imersão das próteses diariamente numa solução de gluconato de clorexidina ou de salicilato por poucos minutos causa uma redução significativa na quantidade de biofilme e promove uma melhora na mucosa de pacientes com estomatite protética. O gluconato de clorexidina é um desinfetante bastante utilizado como agente antimicrobiano, é ativo contra uma série de micro-organismos gram-positivos e gram-negativos, fungos, leveduras, anaeróbios facultativos e aeróbios. Seu efeito clínico baseia-se na inibição do desenvolvimento do biofilme e melhora a condição da mucosa do paciente, combatendo a estomatite protética. Em baixas concentrações é bacteriostático e em altas concentrações é bactericida. Porém torna-se impróprio para imersão diária das próteses, por causar a formação de manchas amarelas e marrons, além de apresentar gosto amargo (Budtz-Jorgensen¹³, 1981). No estudo de Rowe e Forrest⁸¹, em 1978, observou-se que a imersão da prótese em clorexidina a 2% reduziu a formação de placa bacteriana e melhorou a condição da mucosa do paciente. O produto apresenta uma baixa toxicidade e não tem relatos de alterações teratogênicas e nem a presença de produtos catabólicos cancerígenos ou de retenção permanente da

droga no organismo. A imersão noturna das próteses numa solução de gluconato de clorexidina previne a recorrência da infecção. Entretanto, a acentuada descoloração que este produto provoca nas próteses torna-o inapropriado para o uso diário. O tempo de imersão da prótese depende do grau da concentração da clorexidina (Lima et al.⁵⁸, 2004). De acordo com Cheng et al.¹⁹, 2008, a clorexidina é ativa contra uma série de micro-organismos gram-positivos e gram-negativos, fungos, leveduras, anaeróbios facultativos e aeróbios. A adsorção da clorexidina pelos micro-organismos resulta em mutação dos componentes intracelulares. Pequenas concentrações de clorexidina com substâncias de pequeno peso molecular como o fósforo e o potássio tem efeito bacteriostático. Em grandes concentrações, o efeito é bactericida porque precipita ou coagula o citoplasma. Silva et al.⁹³, em 2008, afirma que o gluconato de clorexidina tornou-se um componente básico dos dentifrícios pela sua característica de substantividade, sendo liberado lentamente na cavidade bucal, sua atividade antibacteriana persistindo por diversas horas após o seu uso. Por essa razão, é um agente eficaz na redução do biofilme.

Sesma et al.⁸⁶, em 1999, afirmam que os ácidos não são indicados para a limpeza de próteses parciais removíveis convencionais por causarem o enfraquecimento à parte metálica, podem ser utilizados para próteses parciais removíveis provisórias. Os ácidos agem tanto na superfície da resina como em profundidade e possuem ação fungicida principalmente sobre *Candida albicans*. O ácido peracético foi introduzido no mercado internacional em 1955 como um agente desinfetante ou esterilizante e principalmente utilizado nas indústrias de alimentos e de tratamentos de águas e esgoto. Pode ser utilizado para descontaminação de isolantes plásticos e equipamentos médicos. Seus

constituintes principais são: peróxido de hidrogênio e ácido acético, que dependendo da concentração pode ser um ácido corrosivo e irritante. Ele atua pela liberação do oxigênio livre e dos radicais hidroxilas, decompondo-se em água, oxigênio e ácido acético (Clen²⁰, em 1998). Sharbaugh et al.⁸⁷, em 1997, concluíram que o ácido acético é um análogo ao peróxido de hidrogênio, sendo muito rápido e com atividade de amplo espectro contra bactérias, fungos, vírus e esporos bacterianos. Além disso, quando diluído em água, apresenta um pH próximo a neutro, não sendo tóxico a pele, nem a mucosa. É de fácil manipulação, porém apresenta um odor desagradável.

De acordo com Glass³⁵, em 1992, o vinagre, cujo o principal componente é o ácido acético, apresenta preço acessível, podendo ser utilizado por indivíduos de renda familiar menor, além disso, no estudo, recomendou a utilização de solução de vinagre a 5% para desinfecção de próteses e aparelhos ortodônticos removíveis. O vinagre de maçã, de acordo com Estrela et al.²⁹, em 2007, é obtido através da fermentação da fruta, a qual é posteriormente oxidada como os outros tipos de vinagre. No caso da versão com a maçã, a fruta sofre um processo de fermentação por leveduras benéficas e por bactérias chamadas acetobacter (Zandim et al.¹¹², em 2004). Os açúcares naturais são transformados em álcool e depois este é convertido em ácido acético. Em comparação do vinagre de maçã a outros tipos de vinagre, optou-se por usar o de maçã no presente estudo porque esta solução apresenta apenas 5% de ácido acético, enquanto, por exemplo, o vinagre de vinho branco apresenta 24% de ácido acético e o vinagre de limão apresenta 37% de ácido acético (Silva et al.⁹¹, em 2003). A concentração usual no vinagre de maçã é de 5% de ácido acético e 95 % de água, além de alguns minerais, vitaminas e fitoquímicos, como os

polifenóis (Rizzon e Miele ⁸⁰, em 2003), que ajudam a proporcionar inúmeros benefícios, tais como: ação digestiva, que age como um adstringente, contribuindo para a diminuição da gordura corporal, ação de desinfecção de superfícies e materiais, fonte de ferro, antioxidantes, vitaminas, enzimas e ácidos orgânicos. Porém, para Phillips I et al.⁷⁸, em 1968, o vinagre de maçã apresenta uma coloração marrom-avermelhada e pode alterar a cor dos materiais promovendo manchamentos e a presença do ácido acético pode ser considerado um irritante oral. Os dados encontrados até presente data, demonstram que os componentes do vinagre, como ácido acético, está associado com a citotoxicidade. De acordo com Wu et al.¹¹¹, em 2007, o bicarbonato de sódio e o vinagre têm pH opostos, isto é, alcalino e ácido, respectivamente, o que permite que se possa fazer uma combinação no uso desses produtos, para que não haja irritação, provocando injúrias na mucosa oral.

Nogaroto e Penna⁷¹, em 2006, relatam que mesmo sendo eficientes na limpeza de próteses totais e parciais removíveis, existem poucos agentes químicos disponíveis no mercado nacional. Além disso, nem todos os pacientes têm condição financeira e orientação de adquirir tais produtos. Nos casos em que o usuário não tiver acesso a nenhum tipo de produto químico, a orientação é de que a prótese fique mantida imersa em água. Esta medida visa impedir que a resina perca água para o ambiente, e conseqüentemente, sofra qualquer alteração dimensional da prótese.

3.2.3 Método combinado

O método combinado de desinfecção consiste na associação do uso de escova e dentifrício específicos para prótese e, concomitantemente, a imersão em soluções químicas (Cotrin²¹, em 2000). A vantagem deste método é proporcionar um meio efetivo de limpeza, uma vez que os agentes químicos têm atividade antimicrobiana superior se comparado ao método de limpeza manual. Apenas o uso de escova e pasta abrasiva não promove remoção dos microorganismos presentes na resina da prótese. Isto se deve às depressões e irregularidades presentes na resina, que favorecem a colonização por bactérias e leveduras, tornando mais difícil a remoção mecânica das mesmas. Lee et al.⁵⁴, em 1985, relataram que vários métodos de limpeza de próteses foram avaliados quanto a sua eficácia e que nenhum foi aceito como o melhor. Os autores avaliaram métodos populares de limpeza e tentaram desenvolver uma técnica simples de higienização. Dos resultados obtidos, o método combinado (escovação e higienizador do tipo imersão) foi o método mais efetivo de limpeza, sendo que a escovação deve ser precedida pela imersão. No estudo de Catão et al.¹⁶, em 2007, observou-se que a importância da associação métodos mecânico e químico na higienização de prótese total. É necessário que os portadores de aparelhos protéticos saibam realizar corretamente e diariamente a higienização mecânica das próteses e que façam uso de hipoclorito de sódio a 2,25% (água sanitária de uso doméstico) através da imersão da prótese em solução de 15 ml de hipoclorito de sódio em 200 ml de água durante 10 minutos, a cada 4 dias, pois após este período, inicia-se a recolonização das próteses por *S. mutans* e *C. albicans*, associado a escovação. Esta técnica se mostrou muito

eficiente por remover aproximadamente 100% do biofilme em 37% da amostra, não apresentando qualquer resultado ineficaz.

Cruz et al.²⁴, em 2005, realizaram uma pesquisa que comparou clinicamente a eficácia do método químico (pastilha efervescente) e do método químico-mecânico (escovação e pastilha efervescente) na remoção do biofilme da prótese. Concluíram que o método químico associado ao mecânico se mostrou mais eficiente na remoção do biofilme. Assim, no método combinado, a limpeza mecânica remove os debris e expõe as superfícies polidas e não polidas da prótese e as soluções químicas atuam contra os micro-organismos não removidos pela escovação situados mais profundamente (Carvalho et al.¹⁴, 2003). A associação dos métodos mecânico e químico foi considerada como a conduta de eleição para higienização das próteses pela maior parte dos autores. É importante lembrar que o perborato de sódio a 3,8%, principal componente principal componente das pastilhas efervescentes, é um sal de sódio do ácido perbórico, um sólido branco, inodoro, solúvel em água (Fonseca et al.³³, em 2007). Além disso, para Souza JA e Reges RV⁹⁵, em 2003, o perborato de sódio sofre hidrólise em contato com a água e essa solução efervescente, é uma fonte de oxigênio ativo, sendo usado para a elaboração de produtos como detergentes, produtos de limpeza, descorantes e branqueadores.

Para Cruz²⁴, em 2005, é indispensável que o profissional não negligencie a indicação de soluções químicas de higienização, uma vez que são um meio alternativo e auxiliar. Dessa forma, deve-se considerar a correta instrução ao paciente, tipo de limpador para cada tipo de prótese removível, tempo de imersão da prótese na solução limpadora (de acordo com o fabricante) e enxague abundante após a imersão.

3.3 Avaliação da Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade dos materiais odontológicos podem ser realizadas análises quantitativas ou qualitativas. A análise quantitativa mede o número de células após proliferação ou inibição celular, o número de colônias formadas ou, ainda, quantifica as células por meio da contagem de seus componentes, como proteínas e mitocôndrias, ou pela proliferação ou inibição do material genético. A análise qualitativa avalia as células microscopicamente, observando as alterações morfológicas, como vacuolização citoplasmática e lise de suas membranas. (International Standard Organization. ISO 10993-5:1992.)⁴¹

Para Hensten-Pettersen³⁸, 1988 e Hensten-Pettersen e Wictorin³⁷, 1981, o teste da citotoxicidade utilizando o método da cultura de células tem sido considerado relativamente simples, reproduzível, efetivo e controlado. Hensten-Pettersen³⁸, em 1988, realizou uma revisão de literatura com o objetivo de comparar os métodos que avaliam a citotoxicidade dos materiais odontológicos e observou que diferentes métodos podem ser utilizados para monitorar os efeitos citotóxicos, como a inibição do crescimento celular, a citólise, as modificações na membrana ou no citoplasma e as alterações na atividade metabólica. Muitos testes de citotoxicidade são realizados utilizando extratos obtidos a partir do contato entre as amostras dos materiais e o meio de cultura. Quando da obtenção de extratos, o autor relatou alguns dos fatores que podem influenciar nos resultados, como o tempo e a temperatura para a extração e a média entre o volume do meio e a superfície do corpo-de-prova. Contudo, Tang et al.⁹⁸, em 1999, concluiu que alguns materiais odontológicos apresentaram-se

tóxicos em alguns estudos e não tóxicos em outros, dependendo das condições em que os testes foram realizados, mostrando, assim, a necessidade da padronização dos testes de citotoxicidade. Além disso, estudos mostraram que o pH também é um fator que pode influenciar na biocompatibilidade dos materiais.

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de resinas acrílicas para bases de próteses de acordo com o método de processamento, o tipo de polímero e as condições de armazenagem, Hensten-Pettersen e Wictorin³⁷, 1981, realizaram um estudo utilizando resinas termo e autopolimerizáveis. Para cada tipo de polimerização, auto e termo, dois tipos de processamento foram realizados. Os resultados mostraram que os diferentes métodos de processamento não influenciaram significativamente no efeito citotóxico. Em função do tipo de polimerização, houve crescimento celular menor para as resinas autopolimerizáveis em relação às termopolimerizáveis, e, para ambas, o crescimento celular foi menor em relação ao grupo controle.

Pelo fato dos testes de citotoxicidade in vitro apresentarem um grande número de métodos e materiais, as normas da International Standard 10993-59⁴¹ (1992) padronizam esses testes e selecionam o método para análise da citotoxicidade mais apropriado para cada material. Com isso, três categorias são listadas: o teste que utiliza extratos, o teste onde há o contato direto do material com as células utilizadas e o teste onde o contato é indireto, por meio da difusão em ágar ou filtros Millipore. É importante lembrar que o contato direto de corpos-de-prova obtidos de diferentes materiais pode causar inibição do crescimento celular decorrente do contato físico e não das substâncias tóxicas liberadas. Wennberg¹⁰⁸, em 1986, relata que em relação a obtenção de extratos, vários

fatores podem influenciar nos resultados, como o tipo e o volume do meio, a área do corpo-de-prova, o tempo e a temperatura para a extração. Além disso, para que as substâncias sejam liberadas dos materiais a serem testados, pode-se utilizar como meio para a extração água destilada, solução salina ou meio de cultura com ou sem soro. A quantidade do material para a obtenção do extrato a ser testado pode ser expressa em peso ou em tamanho, e o volume do extrato obtido depende da relação entre a superfície do corpo-de-prova e o volume do meio. Sobre a produção de extratos, determinados tempos e temperaturas são recomendados, e, na temperatura de 37 °C, o tempo não deve ser menor do que 24 horas. Além disso, a média entre a superfície do corpo-de-prova e o volume do meio utilizado para a extração deve estar entre 6 cm² /ml e 0,5 cm² /ml (International Standard Organization. ISO 10993-5:1992.)⁴¹

Os métodos que avaliam a citotoxicidade dos materiais podem ser agrupados em categorias de acordo com o tipo de análise, tais como a avaliação dos danos pela morfologia celular, medida das células danificadas, medida do crescimento celular e medida de aspectos específicos do metabolismo celular (Jorge et al.⁴⁸, 2004). Testes têm sido utilizados para determinar a citotoxicidade dos materiais, como a incorporação de produtos radioativos, que avalia a síntese de DNA, descrito por Imazato et al.⁴⁰, em 2000, o teste MTT (sal metil tetrazolium), descrito por Mosmann⁶⁷, em 1983, e o teste Alamar Blue ®⁸⁸, o qual reflete o metabolismo celular por meio da atividade mitocondrial. Com eles, pode-se observar, através do método de cultura de células, a proliferação ou a inibição do crescimento celular decorrente do contato com substâncias citotóxicas.

Em relação às soluções normalmente utilizadas para desinfecção de próteses, estudos mostraram que as mesmas, quando em contato direto com

diferentes tipos de células, podem causar danos no metabolismo ou morte celular⁷², sugerindo que a utilização dessas soluções deveria ser vista com cautela.

Pode-se observar que são várias as formas de se testar a citotoxicidade dos materiais odontológicos. Contudo, tais testes, quando adequadamente padronizados, o que é absolutamente necessário, são muito importantes, pois determinam o comportamento biológico dos materiais e/ou de seus componentes, fornecendo um rápido e consistente resultado com relação a sua atividade biológica.

4 MATERIAL E MÉTODO

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

Materiais de Consumo

1. Água destilada
2. Alamar Blue [®], Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Waltham, Massachusetts, USA.
3. Células HaCaT (0341) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
4. Folha de alumínio, Wyda Pratic, Sorocaba, São Paulo, Brasil.
5. Fosfato de Sódio Bi básico Anidro, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
6. Garrafa para cultura de células 75 mL, TPP [®], Trasadingen, Suíça.
7. Gesso pedra tipo III, cor amarela, Durastone, Uberaba, MG, Brasil.
8. Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
9. Placa de 96 orifícios com fundo plano estéril, embalada individualmente, TPP [®], Trasadingen, Suíça.
10. Placa preta de 96 orifícios com fundo plano estéril, embalada individualmente, Thermo Scientific, Roskilde, DN, Dinamarca.
11. Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 uL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.
12. Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 uL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.
13. Ponteiras para pipeta 10 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.

14. Ponteiras para pipeta 5 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.
15. Resina Acrílica Termopolimerizável do tipo base Vipi Wave ® , Vipi Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil.
16. Resina Acrílica de reembasamento Tokuyama Rebase II Fast ® , Ufi Gel Hard, Voco, Cuxhaven, Germany.
17. Solução antibiótico antimicótico com Penicilina G, Estreptomicina e Anfotericina, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
18. Solução de Azul de Tripán 0,4%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
19. Solução desinfetante de Digluconato de Clorexidina a 2%, Farmácia de Manipulação Santa Paula, Araraquara, SP, Brasil.
20. Solução desinfetante de Perborato de Sódio a 3,8%, Farmácia de Manipulação Santa Paula, Araraquara, SP, Brasil.
21. Solução desinfetante de Hipoclorito de Sódio a 0,5%, Farmácia de Manipulação Santa Paula, Araraquara, SP, Brasil.
22. Soro fetal bovino estéril para cultura de células, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
23. Super bonder power flex gel, Henkel Ltda, São Paulo, SP, Brasil.
24. Tripsina 0,5% e EDTA 0,2%, GIBCO Products International, Inc., Langley, OK, USA.
25. Tubo tipo Eppendorf 1,5 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, USA.
26. Tubo tipo Falcon de 15 mL, fundo cônico, estéril cônico TPP, Trasadingen, Suíça.
27. Tubo tipo Falcon de 50 mL, fundo cônico, estéril cônico TPP, Trasadingen, Suíça.

28. Vaselina Sólida, Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Araraquara, SP, Brasil.

29. Vinagre de Maçã 750 mL, Castelo Alimentos SA, São Paulo, SP, Brasil.

Instrumentais

1. Béquer graduado, Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil.

2. Broca Maxi-cut carboneto de tungstênio, Labordental, São Paulo, SP, Brasil.

3. Câmara de contagem Neubauer espelhada Modelo: K5-0111, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.

4. Erlenmeyer graduado, Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil.

5. Espátula nº 24, DUFLEX, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

6. Espátula nº 36, DUPLEX, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

7. Faca para gesso - cabo de madeira, Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil.

8. Garrafa de vidro graduada com tampa 1000 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.

9. Garrafa de vidro graduada com tampa 500 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.

10. Garrafa de vidro graduada com tampa 250 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.

11. Graal para espatulação de gesso – plástico, JOX, São Paulo, SP, Brasil.

12. Matriz pré-confeccionada para obtenção dos corpos de prova de resina acrílica do tipo base, com diâmetro de 1,4 mm e espessura de 1,2 mm, Araraquara, SP, Brasil.

13. Matriz pré-confeccionada para obtenção dos corpos de prova de resina acrílica do tipo reembasamento, com diâmetro de 1,4 mm e espessura de 1,2 mm, Araraquara, SP, Brasil.

14. Mufla acrílica própria para micro-ondas, STG – VIPI, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

15. Pinça clínica, DUFLEX, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

16. Pincel Faber Castell nº 6, São Carlos, SP, Brasil.

17. Pipetador automático eppendorf Modelo: Easypet 3, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha.

18. Placa de vidro medindo 4 cm x 4 cm x 0,5 cm, pré-fabricada, Araraquara, SP, Brasil.

19. Placa de vidro polida com 15mm, JOX, São Paulo, SP, Brasil.

20. Placa de vidro polida com 10mm, JOX, São Paulo, SP, Brasil.

21. Pote Dappen em vidro, Maquira, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Equipamentos

1. Agitador Magnético com aquecimento modelo 78-HW-1, Biomixer.

2. Agitador tipo vórtex modelo: VM-3000, Vixar, Plymouth, MN, USA.

3. Autoclave horizontal de bancada modelo AB 25, série: 03026, Phoenix Ind. E Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil.

4. Autoclave vertical modelo: AV 60 N° 6614, Phoenix Ind. E Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil.

5. Balança de precisão modelo: BG 400 N° 016450, GEHAKA – Ind. e Com. Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil.

6. Banho Maria modelo 1102, Fanem, Guarulhos, SP, Brasil.

7. Estufa de CO₂ modelo 3100, Thermo Scientific, Marietta, Ohio, USA.

8. Estufa de cultura modelo 002 CB, Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
9. Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, Marietta, Ohio, USA.
10. Microscópio Invertido modelo 403, série: 1207159, Optiphase, Van Nuys, CA, USA.
11. PHmetro de bancada modelo Q400AS, série: 14024666. Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil.
12. Prensa Hidráulica, Delta, São Paulo, SP, Brasil.

METODOLOGIA

Confecção de corpos de prova com resina acrílica para base de prótese:

Os corpos de prova com resina acrílica termopolimerizável para base de prótese (Vipi Wave ® , Vipi Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil.) foram confeccionados a partir de matrizes metálicas vazadas, em forma de discos contendo no seu interior um orifício com 14 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura (Figura 1).

Figura 1 – Materiais usados para confecção de corpos de prova com resina acrílica termopolimerizável para base de prótese.



Fonte: Elaboração própria.

Para a inclusão da matriz na mufla, a parte inferior da mufla (base da mufla) foi vaselinada e preenchida com gesso pedra tipo III. Antes da presa do gesso, uma placa de vidro medindo 4 cm x 4 cm x 0,5 cm (possuindo o mesmo tamanho da matriz) e a matriz foram vaselinadas e inseridas sobre o gesso. A matriz foi posicionada no gesso de modo que, olhando de perfil, não fosse notado degrau entre a matriz e o limite da mufla. Após a presa, foi colocada outra placa de vidro, também medindo 4 cm x 4 cm x 0,5 cm sobre a matriz (também vaselinada) e foi feito o uso da Super Bonder para que se mantivesse a estabilidade entre a matriz e a placa de vidro. Juntou-se, então, a parte superior da mufla (contra-mufla), adequadamente isolada com vaselina sólida. Em seguida, as partes foram parafusadas e a contra-mufla foi preenchida com nova porção de gesso pedra tipo III, aguardando-se, em seguida, a presa do gesso.

Preparada a mufla (Figura 2), foram confeccionados os corpos de prova através da prensagem da resina acrílica Vipi Wave® (Vipi Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil). A resina foi proporcionada e manipulada de acordo com as recomendações do fabricante (14,6 g de pó com 6,5 mL de líquido) e foi, na sua fase plástica, inserida nos orifícios da matriz incluída na mufla. Posteriormente, as partes superior e inferior da mufla foram encaixadas e os parafusos foram colocados em posição e o conjunto foi levado à prensa hidráulica sob pressão de 1,5 tonelada e assim mantido até que ocorresse a estabilização da pressão.

Figura 2 – Mufla com a matriz incluída.



Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, a mufla foi retirada da prensa. Após o período de descanso de 30 minutos, a resina acrílica foi polimerizada por meio das micro-ondas por 10 minutos com 20% de potência, seguido por mais 4 minutos com 60% de potência, em micro-ondas doméstico com potência máxima de 800W (de acordo com as recomendações do fabricante).

Após a polimerização, cada mufla foi deixada sobre na bancada para resfriamento por 20 minutos e, em seguida, colocada em água corrente por 5 minutos. Então, suas partes foram separadas e as amostras desincluídas. Os excessos de resina foram recortados de cada corpo de prova (Figura 3) com o auxílio de uma broca Maxi-cut.

Figura 3 – Corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável para base de prótese.



Fonte: Elaboração própria.

Confeção de corpos de prova com resina acrílica para reembasamento de próteses:

Os corpos de prova da resina para reembasamento (Tokuyama Rebase II Fast[®], Ufi Gel Hard, Voco, Cuxhaven, Germany) foram confeccionados, a partir de matrizes metálicas vazadas, em forma de discos, contendo no seu interior um orifício medindo 14 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura (Figura 4).

Figura 4 - Materiais usados para confecção de corpos de prova com resina para reembasamento.

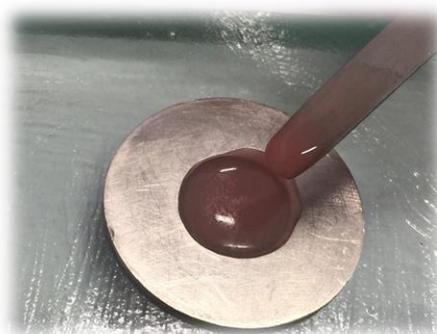


Fonte: Elaboração própria.

Para a confecção dessas amostras, a resina foi proporcionada e manipulada de acordo com instruções do fabricante (2,4 g de pó para 1 mL de líquido). Antes de inserir a resina na matriz, placas de vidro e as matrizes foram vaselinadas. Após a manipulação da resina, a mesma foi inserida nas matrizes (Figura 5) e prensada manualmente entre as duas placas de vidro até o término da polimerização. Para a remoção das amostras, um êmbolo foi posicionado na matriz de forma a deslocar o corpo de prova (Figura 6) e precavendo a não deformação da amostra. Após a desinclusão, os excessos de resina foram recortados de cada corpo de prova com o auxílio de uma broca Maxi-cut.

Logo após a confecção, todos os corpos de prova, de ambas as resinas, foram lavados em banho de ultrassom utilizando água destilada durante 15 min para remover os resíduos da confecção das resinas. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em água destilada por 48 horas para liberação dos componentes potencialmente tóxicos presente no interior do polímero.

Figura 5 – Resina acrílica para reembasador sendo inserida na matriz.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Corpos de prova de resina para reembasador.



Fonte: Elaboração própria.

Grupos experimentais

Os corpos de prova das resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses foram divididos em grupos ($n=3$) de acordo com o tipo de solução desinfetante: água destilada, digluconato de clorexidina a 2%, perborato de sódio a 3,8%, hipoclorito de sódio a 0,5% e vinagre de maçã, e de acordo com o tempo de imersão: 0, 1, 3 e 6 meses. 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. Ressaltando que as soluções foram trocadas diariamente.

Após cada período de imersão, as amostras foram lavadas em água corrente para remoção do excesso das soluções desinfetantes. Em seguida, foram desinfetadas em banho de ultra-som por 20 minutos e em luz ultravioleta, na capela de fluxo laminar, por mais 20 minutos de cada lado do corpo de prova com o objetivo de eliminar os possíveis micro-organismos remanescentes⁹⁸.

Confecção dos extratos

Para a análise do efeito citotóxico das substâncias incorporadas e liberadas pelos corpos de prova, foram obtidos extratos dessas amostras. Para isso, três corpos de prova de cada grupo experimental, foram colocados dentro de tubos de ensaio com 3 mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e incubados a 37°C por 24 horas (ISO 10993-12:2007)⁴². Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas foram difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos que foram utilizados nos testes de citotoxicidade (Figura 7).

Figura 7 – Corpos de prova com o meio de cultura para confecção de extratos.



Fonte: Elaboração própria.

Cultivo celular

O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelas resinas foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, queratinócitos humanos (HaCaT: 0341), adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivados em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótico antimicótico com 10.000 ug.mL⁻¹ de penicilina G, 10.000 ug.mL⁻¹ de estreptomicina e 25 ug.mL⁻¹ de anfotericina. O cultivo das células foi realizado em garrafas plásticas de 75cm² para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO₂. Essas garrafas foram incubadas em estufa para cultura de células com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada. Para a manutenção da cultura, as células foram cultivadas até atingirem a confluência (90%), lavadas com solução tampão fosfato PBS 1X (NaCl 140 mmol.L⁻¹, KCL 3,0 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 4,30 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,4 mmol.L⁻¹), removidas com solução de tripsina (0,05%)/EDTA (0,53 mmol.L⁻¹) e, então, submetidas a centrifugação com 400xg por 5 minutos. As células foram, posteriormente, ressuspensas em meio de cultura e replaqueadas para novas garrafas. O meio dos queratinócitos foi trocado a cada dois dias, e as células recultivadas, até que o número de células e a confluência adequados fossem obtidos para a execução do experimento. Sendo que as células utilizadas deveriam estar entre a 3^o e a 7^o passagem.

Para a realização do teste de citotoxicidade, as células foram contadas em uma câmara hemocitométrica tipo Neubauer, adicionando o corante Azul de Tripán, e plaqueadas na quantidade de 1,0 x 10⁴ células/poço em placas estéreis de 96 poços. Então, as células foram incubadas em estufa contendo CO₂ a 5% e

à temperatura de 37°C por 24 horas. Após este período, na placa de 96 orifícios contendo as células, adicionou-se 100 µL do extrato contendo as substâncias liberadas pelos corpos de prova e levou-se novamente a placa em estufa contendo CO₂ a 5% e à temperatura de 37°C por 24 horas. Para cada grupo experimental, foram destinados quatro compartimentos da placa (análise em quadruplicata). Quatro orifícios da placa não receberam o extrato das substâncias liberadas e receberam apenas 100 µL de meio de cultura novo (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótico antimicótico (controle negativo). Após as 24 horas, foi realizado o teste de citotoxicidade.

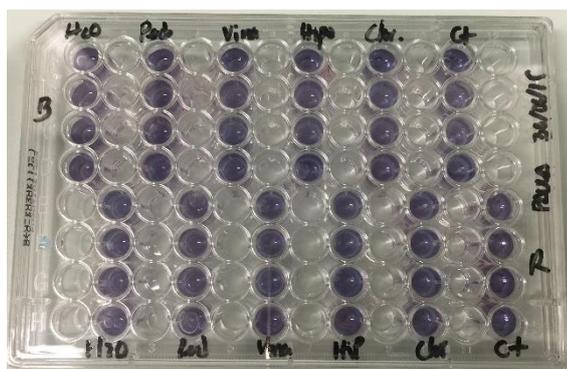
Avaliação do metabolismo celular por meio do teste Alamar Blue:

O metabolismo celular foi verificado por meio da utilização do teste Alamar Blue®. O Alamar Blue® é um teste simples e rápido, em que 10% da solução comercialmente disponível são adicionados ao meio celular e medidos por colorimetria ou fluorimetria⁴⁸. No entanto, maior sensibilidade é conseguida utilizando a propriedade fluorescente. O ensaio apresenta um indicador de crescimento fluorimétrico com base na detecção da atividade metabólica. Especificamente, o sistema incorpora um indicador de oxidação-redução (REDOX), que gera produto fluorescente e muda de cor em resposta à redução química. Além disso, o Alamar Blue® não é tóxico para as células e não interfere na viabilidade celular, como ocorre com o Azul de Trypan⁴⁰ e não se faz necessário descartar as células para obter medições subsequentes, como ocorre com o teste MTT⁶⁷.

Após as 24 horas de incubação das células em contato com os extratos, para cada orifício da placa (Figura 8) foram adicionados 20 µL de Alamar Blue® diluídos em 100 µL de meio de cultura (10% do volume total de

meio – 200 μ L). A placa foi, então, incubada na estufa contendo CO₂ a 5% e à temperatura de 37°C por mais 4 horas (Figura 9). Após esse período, o conteúdo de cada orifício da placa foi transferido para uma placa preta, também com 96 orifícios e a fluorescência das amostras foi medida usando Fluoroskan Ascent FL (Lab Systems) com um filtro de 544 nm de emissão e 590 nm de transmissão.

Figura 8 – Placa de 96 orifícios contendo extratos e células após inclusão do Alamar Blue®.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 – Placa de 96 orifícios contendo extratos e células + Alamar Blue® depois de 4 horas mantida na estufa.



Fonte: Elaboração própria.

Medidas do pH

Utilizando-se pHmetro digital foram feitas as aferições dos valores de pH de todas as soluções desinfetantes utilizadas neste estudo.

Análise dos resultados:

Foram realizadas duas análises separadamente, uma quantitativa e outra qualitativa. Na análise quantitativa, empregou-se uma análise de variância de três fatores para avaliar, pelas porcentagens de células viáveis, a citotoxicidade entre duas resinas acrílicas, armazenadas em diferentes soluções desinfetantes por determinados períodos. Esta análise foi complementada por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, ambas ao nível de significância de 5%. Além disso, para complementar a análise estatística, os resultados de cada grupo experimental foram comparados com o grupo controle negativo (considerado 100% de viabilidade) e os grupos foram classificados de acordo com o efeito citotóxico em (análise qualitativa): 0 – não citotóxico (inibição menor do que 25% em relação ao grupo controle), 1 – discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50% em relação ao grupo controle), 2 – moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75% em relação ao grupo controle) e 3 – intensamente citotóxico (inibição maior do que 75% em relação ao grupo controle).

5 RESULTADO

Pela análise de variância (Tabela 1), somente apresentaram efeitos significativos sobre as porcentagens de células viáveis os fatores desinfetante e tempo de armazenamento, além de sua interação (todos com $p < 0,001$). Isso significa que os resultados são equivalentes para as duas resinas acrílicas, mas a ação do tempo de armazenamento depende da solução desinfetante. Para estudar esta interação foi aplicado o teste de Tukey, cujo resultado está resumido na Tabela 2. Na Tabela 2 também são mostradas as médias e desvios padrão de porcentagens de células viáveis, em relação ao controle tomado como 100%, determinadas sobre medidas de fluorescência (teste Alamar Blue), de acordo com o tipo de resina acrílica (base e reembasamento), com a solução desinfetante (água destilada, perborato de sódio 3,8%, hipoclorito de sódio 0,5%, vinagre e clorexidina 2%) e com o tempo de armazenamento na solução (0, 1, 3 e 6 meses).

Observa-se que, independentemente da resina utilizada, as soluções desinfetantes podem ser divididas em dois grupos equivalentes entre si quanto à viabilidade celular. O primeiro, formado pela água, perborato de sódio e hipoclorito de sódio, com viabilidade celular acima de 85% em todo o período experimental, sem que as alterações fossem estatisticamente significativas durante os 6 meses da experimentação. Esta inibição menor do que 15% permite classificar as três soluções como não citotóxicas. O segundo grupo, constituído pelo vinagre e clorexidina, já no primeiro mês teve uma redução de células vivas em cerca de 45% relativamente ao controle (toxicidade discreta), enquanto no terceiro mês a redução foi próxima de 95%, mantendo-se neste patamar até o final aos 6 meses, mostrando efeito intensamente citotóxico.

Na Figura 10 estão representadas as médias amostrais de porcentagens de células viáveis, junto com intervalos de 95% para as médias populacionais, construídos com base no desvio padrão fornecido pelo resíduo da análise de variância. Além de estimar a precisão sobre as médias, esses intervalos ajudam na interpretação dos resultados dos testes estatísticos, na medida em que, quanto menor a sobreposição, maior será a evidência de diferença entre as médias. Desse modo, um critério para identificar os grupos equivalentes ao controle, é verificar se o intervalo de confiança inclui o valor 100%.

Tabela 1 – Sumário da análise de variância (ANOVA) sobre porcentagens de células viáveis.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	Valor p
Resina	1	12,96	0,72	0,400
Tempo	3	8211,91	453,83	<0,001 *
Desinfetante	4	23095,56	1276,38	<0,001 *
Resina x Tempo	3	15,24	0,84	0,475
Resina x Desinfetante	4	16,98	0,94	0,446
Tempo x Desinfetante	12	2822,02	155,96	<0,001 *
Resina x Tempo x Desinfetante	12	5,28	0,29	0,989
Resíduo	80	18,09		

* significativo ao nível de 5% (Nota: O resumo das comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey, referentes à interação Tempo x Desinfetante, o único efeito a ser detalhado, estão resumidas na Tabela 1.

Fonte: Elaboração própria

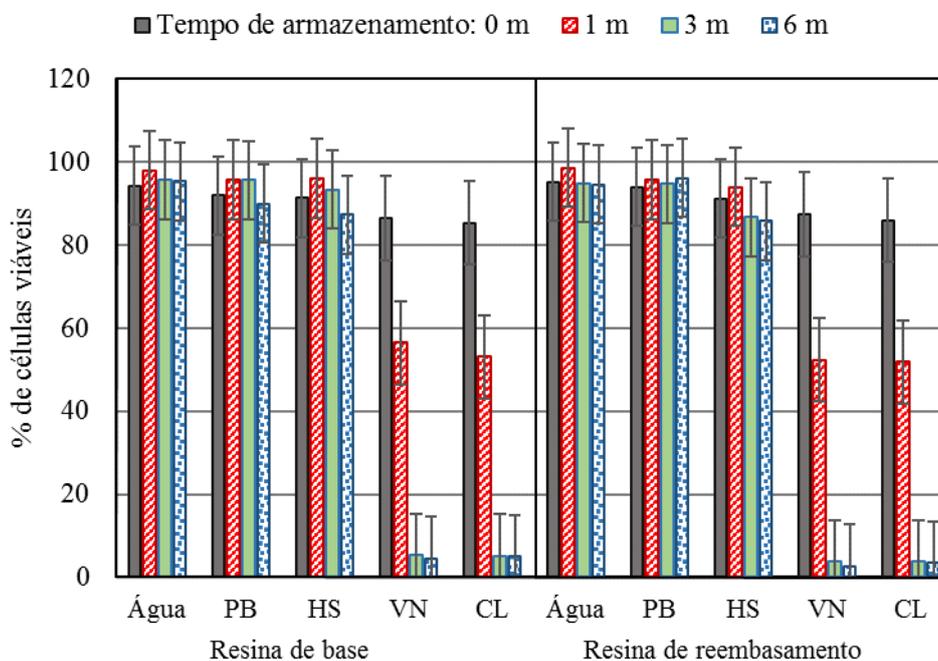
Tabela 2 – Médias e desvios padrão de porcentagens de células viáveis de acordo com o tipo de resina, solução desinfetante e tempo de armazenamento.

Resina	Solução desinfetante	Tempo de armazenamento (meses)			
		0	1	3	6
Base	Água	94,2 (6,1) ^{Aa}	97,9 (1,0) ^{Ba}	95,7 (4,0) ^{Ba}	95,3 (4,2) ^{Ba}
	Perborato	91,9 (7,0) ^{Aa}	95,7 (3,6) ^{Ba}	95,6 (3,4) ^{Ba}	89,9 (4,0) ^{Ba}
	Hipoclorito	91,3 (2,5) ^{Aa}	96,0 (5,5) ^{Ba}	93,4 (6,1) ^{Ba}	87,2 (6,6) ^{Ba}
	Vinagre	86,5 (7,4) ^{Ac}	56,5 (7,2) ^{Ab}	5,3 (1,7) ^{Aa}	4,6 (2,3) ^{Aa}
	Clorexidina	85,3 (3,8) ^{Ac}	53,1 (5,5) ^{Ab}	5,1 (1,5) ^{Aa}	5,0 (3,2) ^{Aa}
Reemb.	Água	95,1 (0,3) ^{Aa}	98,6 (2,1) ^{Ba}	94,9 (1,2) ^{Ba}	94,6 (5,0) ^{Ba}
	Perborato	93,9 (1,8) ^{Aa}	95,7 (2,6) ^{Ba}	94,7 (2,1) ^{Ba}	96,1 (5,9) ^{Ba}
	Hipoclorito	91,2 (2,2) ^{Aa}	94,0 (4,9) ^{Ba}	86,7 (5,0) ^{Ba}	85,8 (7,0) ^{Ba}
	Vinagre	87,4 (2,0) ^{Ac}	52,4 (5,6) ^{Ab}	3,7 (0,2) ^{Aa}	2,7 (1,2) ^{Aa}
	Clorexidina	85,9 (5,9) ^{Ac}	51,8 (3,8) ^{Ab}	3,7 (0,2) ^{Aa}	3,5 (1,9) ^{Aa}

Médias acompanhadas de letras iguais, maiúsculas na coluna ou minúsculas na linha, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Fonte: Elaboração própria

Figura 10 – Médias amostrais (colunas) e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras de erro) de porcentagens de células viáveis para duas resinas acrílicas, de acordo com a solução desinfetante e o tempo de armazenamento (PB: perborato de sódio 3,8%, HS: hipoclorito de sódio 0,5%, VN: vinagre e CL: clorexidina 2%).



Fonte: Elaboração própria

Os valores do pH de cada solução desinfetante estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - pH das soluções.

Solução Desinfetante	pH
água destilada	7,2
digluconato de clorexidina 2%	3,9
perborato de sódio 3,8%	6,7
hipoclorito de sódio 0,5%	5,1
vinagre de maçã	2,8

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Uma das preocupações em usuários de próteses removíveis parciais e/ou totais é a prevenção da estomatite protética. Dentre os métodos de prevenção, a limpeza das próteses tem sido considerada fator essencial. A desinfecção química associada ao método de escovação é considerado o procedimento mais indicado¹². Porém, a incorporação de substâncias nas resinas acrílicas tanto de base quanto de reembasamento durante a imersão das próteses em soluções desinfetantes, a longo prazo, pode ocorrer, possibilitando a irritação dos tecidos bucais, uma vez que essas soluções são comprovadamente tóxicas aos tecidos⁸⁹. Neste aspecto, nenhum estudo foi encontrado na literatura. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito cumulativo, por período de 6 meses, de soluções desinfetantes na citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses. A hipótese avaliada de que o uso de diferentes soluções desinfetantes, por período de 6 meses, poderia influenciar a citotoxicidade das resinas acrílicas para bases e reembasamento de próteses foi parcialmente aceita.

Para a análise da viabilidade celular, utilizamos no presente estudo, o teste Alamar Blue ®, o qual apresenta um indicador de crescimento fluorimétrico com base na detecção da atividade metabólica. Especificamente, o sistema incorpora um indicador de oxidação-redução (REDOX), que gera produto fluorescente e muda de cor em resposta à redução química¹⁰⁹. O Alamar Blue ® não é tóxico para as células e não interfere na viabilidade celular, como ocorre com o Azul de Trypan⁸⁸. Além disso, em estudo anterior foi considerado mais sensível do que os teste MTT⁶⁷. Todos os testes citados avaliam o metabolismo

celular por meio da atividade mitocondrial. A diferença entre os testes é que o Alamar Blue é um teste fluorimétrico, enquanto que os outros testes são colorimétricos. Assim, em comparação entre esses outros testes, o Alamar Blue[®] é um procedimento extremamente simples, realizado em somente uma etapa, reprodutível, econômico e não tóxico¹⁰⁹. O procedimento de único passo permite a medição de grande número de amostras e contribui para a elevada precisão da técnica⁷². Pelos aspectos acima descritos, a utilização de outros testes para o mesmo objetivo (análise da citotoxicidade) foi considerada desnecessária.

Durante a imersão em soluções desinfetantes, as resinas acrílicas para base ou reembasamento de próteses podem absorver e/ou liberar componentes para o meio, e os efeitos decorrentes desse processo sobre as propriedades físicas e mecânicas das resinas tem sido estudado. Por exemplo, no estudo de Davi et al.²⁶, 2010, foi analisado que o hipoclorito de sódio com concentração de 1%, influencia a estabilidade de cor e resistência à flexão da resina, por isso no presente estudo fizemos o uso do hipoclorito de sódio com concentração a 0,5%, além disso, o hipoclorito de sódio a 1% pode promover branqueamento das bases acrílicas e corrosão dos componentes metálicos das próteses¹. Em relação à citotoxicidade, foi encontrado que o hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, possui efeito negativo sobre a viabilidade celular^{64,3,102}.

O digluconato de clorexidina a 2% é indicado em aplicações não dentais, tais como: preparação da pele antes da cirurgia, desinfecção de utensílios, superfícies e ambientes⁹². Esse tipo de solução é dita na literatura como um dos melhores agentes bacteriostático e bactericida¹⁰², porém o seu uso indiscriminado, sem a orientação de um profissional e a longo prazo poderia

acarretar, em relação a desinfecção de próteses, a alteração da cor da resina e interferência na sensação gustativa do paciente⁷⁴. Além disso, estudos mostraram que o digluconato de clorexidina também apresenta efeitos citotóxicos quando em contato direto com as células⁵⁹.

O perborato de sódio a 3,8% é o principal componente encontrado no Corega Tabs ®, o perborato de sódio é um sal de sódio do ácido perbórico, um sólido branco, inodoro, solúvel em água⁸⁶. Por conter ácido na sua fórmula, em casos de desinfecção de próteses, resíduos dessa solução em contato com a mucosa do paciente pode desencadear uma irritação¹⁰⁷. O perborato de sódio sofre hidrólise em contato com a água e essa solução efervescente, é uma fonte de oxigênio ativo¹⁰⁴, sendo usado para a elaboração de produtos como detergentes, produtos de limpeza, descorantes e branqueadores⁹⁷.

O vinagre de maçã é obtido através da fermentação da fruta, a qual é posteriormente oxidada como os outros tipos de vinagre²⁹. No caso da versão com a maçã, a fruta sofre um processo de fermentação por leveduras benéficas e por bactérias chamadas acetobacter¹¹². Os açúcares naturais são transformados em álcool e depois este é convertido em ácido acético. Em comparação do vinagre de maçã a outros tipos de vinagre, optou-se por usar o de maçã no presente estudo porque esta solução apresenta apenas 5% de ácido acético, enquanto, por exemplo, o vinagre de vinho branco apresenta 24% de ácido acético e o vinagre de limão apresenta 37% de ácido acético⁸⁰. A concentração usual no vinagre de maçã é de 5% de ácido acético e 95 % de água, além de alguns minerais, vitaminas e fitoquímicos, como os polifenóis³⁵, que ajudam a proporcionar inúmeros benefícios, tais como: ação digestiva, que age como um adstringente, contribuindo para a diminuição da gordura corporal,

ação de desinfecção de superfícies e materiais, fonte de ferro, antioxidantes, vitaminas, enzimas e ácidos orgânicos⁹¹. Porém, por apresentar uma coloração marrom-avermelhada, o vinagre de maçã pode alterar a cor dos materiais promovendo manchamentos e a presença do ácido acético pode ser considerado um irritante oral. Os dados encontrados até presente data, demonstram que os componentes do vinagre, como ácido acético, está associado com a citotoxicidade⁷⁸.

Os resultados deste estudo mostraram que ambas as resinas acrílicas avaliadas (base e reembasador) apresentaram o mesmo comportamento, independentemente da solução desinfetante ou tempo de armazenamento. Esses resultados não estão de acordo com os encontrados na literatura, os quais relatam que os materiais reembasadores são mais tóxicos do que as resinas para base de próteses^{46,47,109,26}. A similaridade no comportamento das resinas avaliadas no presente estudo pode ser explicada em função do tempo de armazenamento (48 horas) das amostras em água destilada anteriormente à divisão dos grupos.⁴ Durante esse tempo, as substância potencialmente tóxicas, de ambas as resinas, provavelmente foram liberadas no meio, equiparando-se os materiais.

No tempo zero, foi possível observar que todos os grupos experimentais apresentaram porcentagem de viabilidade celular acima de 80% comparado ao grupo controle (considerado 100% de viabilidade). Assim, todos os grupos foram considerados não citotóxicos. Neste tempo, não houve diferenças estatísticas significativas em relação ao tipo de solução ou material utilizados. Porém, discreta citotoxicidade dos grupos era esperada em função dos componentes das resinas. Estudos anteriores mostraram que resinas

acrílicas para base e reembasamento de próteses foram consideradas tóxicas, pois inibiram a proliferação celular em relação ao controle^{48,83,88}. Essa citotoxicidade das resinas pode ser explicada em função dos seus componentes, os quais são liberados no meio de cultura durante a obtenção dos extratos⁴². As diferenças encontradas em relação ao presente estudo também pode ser explicada pelo tempo de armazenamento (48 horas) das amostras em água destilada anteriormente à divisão dos grupos. Esse armazenamento foi considerado importante em nosso estudo para que as substância potencialmente citotóxicas provenientes das resinas fossem liberadas e não interferissem com a possível toxicidade das soluções desinfetantes.

Após 1 mês de armazenamento nas soluções desinfetantes, os resultados mostraram que, para ambas as resinas, a imersão das amostras em digluconato de clorexidina a 2% e em vinagre de maçã diminuiu o metabolismo celular dos queratinócitos em cerca de 45% relativamente ao controle e os extratos foram considerados discretamente citotóxicos. Para as mesmas soluções, nos períodos de 3 e 6 meses, os extratos das foram considerados intensamente citotóxicos, pois a redução do metabolismo celular foi próxima de 95%, mostrando efeito intensamente citotóxico.

O armazenamento das amostras nas demais soluções (água destilada, perborato de sódio 3,8% e hipoclorito de sódio 0,5%), não alterou o metabolismo celular, tendo sido os grupos considerados não citotóxicos, com viabilidade celular acima de 85% em relação ao controle, sem que as alterações fossem estatisticamente significativas durante os 6 meses da experimentação. Esta inibição menor do que 15% permitiu classificar as três soluções como não citotóxicas.

Esses resultados poderiam ser explicados em função do pH das soluções. Digluconato de clorexidina a 2% (pH: 3,9) e vinagre de maçã (pH: 2,8) apresentaram os menores valores de pH. O pH ácido pode ter favorecido a degradação superficial das resinas acrílicas e, conseqüentemente, a liberação de componentes tóxicos para o meio. Estes resultados estão em conformidade com Koda et al.⁵¹, 1990, no seu estudo, as concentrações de monômero residual aumentou com a diminuição do pH. Da mesma forma, Lefebvre et al.⁵⁵, 1994 demonstraram que o pH do meio afeta a quantidade de substâncias citotóxicas. Assim, alguns componentes podem agir como solventes na superfície das resinas, sendo considerados potenciais fontes de danos, ou seja, as amostras imersas nestas soluções podem ter sido mais susceptíveis à liberação de substâncias potencialmente tóxicas às células. Todavia, nenhum estudo semelhante foi encontrado na literatura, impossibilitando comparações diretas.

Alguns estudos mostram a absorção de desinfetantes sobre dispositivos médicos. De acordo com Ryu et al.⁸², deve haver consideração não só sobre a toxicidade do desinfetante residual de má lavagem, mas também sobre a toxicidade que resultaria dos desinfetantes que foram absorvidos e, conseqüentemente, liberadas dos dispositivos médicos ou materiais.

As amostras imersas em digluconato de clorexidina a 2% e vinagre de maçã tiveram sua toxicidade aumentada de acordo com o tempo de armazenamento, inibindo quase que totalmente o metabolismo celular após 6 meses. O aumento da toxicidade com o tempo poderia ser explicado em função da troca diária das soluções desinfetantes. Dessa forma, diariamente as amostras foram expostas a soluções com baixo pH, perpetuando as condições de degradação e liberação de componentes tóxicos. Os resultados do presente

estudo trazem informações importantes a respeito da citotoxicidade de resinas acrílicas após diferentes períodos de armazenamento em diferentes soluções desinfetantes, uma vez que os componentes tóxicos, difundidos em meio aquoso, podem ser capazes de agir inclusive em locais distantes da área de contato da prótese. Dessa forma, áreas extensas de mucosa podem ficar expostas a componentes tóxicos por longo período de tempo⁵⁴. Porém, algumas limitações devem ser consideradas.

Dentre as limitações do presente estudo podemos citar a análise da citotoxicidade em monocamadas de células. Além disso, os resultados dos testes de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas. Dessa forma, estudos em tecidos reconstituídos e in vivo são sugeridos para complementação dos resultados aqui obtidos. Todavia, é importante destacar que os testes de citotoxicidade, quando adequadamente padronizados, o que é absolutamente necessário, são muito importantes pois determinam o comportamento biológico dos materiais e/ou de seus componentes, fornecendo um rápido e consistente resultado com relação a sua atividade biológica. Além disso, os estudos in vitro têm a vantagem de permitir fácil controle dos fatores experimentais, o que fornece confiabilidade aos experimentos.

7 CONCLUSÃO

Levando-se em consideração as limitações do presente estudo, pôde-se concluir que:

1. 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;

2. 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;

3. As duas resinas acrílicas avaliadas tiveram comportamento semelhante em relação à sua biocompatibilidade após imersão nas diferentes soluções.

REFERÊNCIAS*

- 1- Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers: review of the literature. *Gerodontology*. 1985; 10(1): 202-6.
- 2- Abere DJ. Post-placement care of complete and removable partial dentures. *Dent Clin North Am*. 1979; 23(1): 143-51.
- 3- Alaçam T, Omürlü H, Ozkul A, Görgül G, Misirligil A. Cytotoxicity versus antibacterial activity of some antiseptics in vitro. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1993; 35(1): 22-7.
- 4- Almeida JR AA, Neves ACC, Araújo CCN, Ribeiro CF, Oliveira JLG, Rode SM. Avaliação de hábitos de higiene bucal em portadores de próteses removíveis da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe. *Comun Ciênc Saúde*. 2006; 17(4): 283-9.
- 5- Andrade ED. Terapêutica medicamentosa em odontologia: procedimentos clínicos e uso de medicamentos nas principais situações na prática odontológica. São Paulo: Artes Médicas; 2000. 180 p.
- 6- Andrade IM. Avaliação da ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre estreptococos do grupo mutans, presentes em próteses totais [Dissertação de Mestrado] Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.
- 7- Andrade NJ, Macêdo JAB. Higienização na indústria de alimentos. São Paulo: Livraria Varela; 1996.

* De acordo com as normas de defesa de mestrado da FOAR/UNESP, baseado nas normas Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 8- Andrucioi MC, Macedo LD, Panzeri H, Lara EH, Paranhos HF. Comparison of two cleansing pastes for the removal of biofilm from dentures and palatal lesions in patients with atrophic chronic candidiasis. *Braz Dent J.* 2004; 15(3): 220-4.
- 9- Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis a review. *J Oral Rehabil.* 1997; 14(3): 217-27.
- 10- Bessems E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *Int Bio Biodeg.* 1998; 41(2): 177-83.
- 11- Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000; 28(2): 141-9.
- 12- Budtz-Jorgensen E. Material and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979; 42(6): 619-23.
- 13- Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of artificial dentures. *J Oral Pathol Med.* 1981; 10(2): 65-80.
- 14- Carvalho LC, Cormack EF. O cuidado dos idosos com suas próteses dentárias. *Rev Bras Odontol.* 2003; 60(3): 167-9.
- 15- Catalán SA. Estomatitis subprotesis: colonización microbiana de materiales bases en prótesis completas. *Rev Asoc Odontol Argentina.* 1981; 69(3): 155-9.
- 16- Catão CDS, Ramos INC, Silva NETO JM, Duarte SMO, Batista AUD, DIAS AHM. Eficiência de substâncias químicas na remoção de biofilme em próteses totais. *Rev Odontol UNESP;* 2007; 36(1): 53-60.

- 17- Chandra J, Mukherjeel PK, Leidichl SD, Faddoul, FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903-8.
- 18- Chau VB. In-depth disinfection of acrylic resins. *J.Prosthet Dent.* 1995; 74(3): 309-13.
- 19- Cheng Y, Sakai T, Moroi R, Nakagawa M, Sakai H, Ogata T, et al. Self-cleaning ability of a photocatalyst-containing denture base material. *Dent Mater J.* 2008; 27(2): 179-86.
- 20- Clen PO. Cleaning and disinfection of equipment for gastrointestinal endoscopy. Report of working party of the British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee. *GUT.* 1998; 42(4): 585-93.
- 21- Cotrin LEF. Procedimentos de biossegurança realizados por cirurgiões-dentistas e laboratórios durante confecção de próteses dentárias. [Dissertação de Mestrado]. Taubaté: Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté; 2000.
- 22- Council. Dental materials, instruments and equipment. Denture cleansers. *J Am Dent Assoc.* 1983; 10(6): 77-90.
- 23- Coutrim, AB. Frequência e caracterização de leveduras na mucosa bucal de usuários de próteses dentárias. *Rev Patol Trop.* 2000; 29(2): 206-12.
- 24- Cruz PC. Método químico versus método químico-mecânico: comparação clínica na eficácia da remoção do biofilme na prótese total. *Braz Oral Rev.* 2005; 19(1): 99.

- 25- Davi LR, Peracini A, Ribeiro NQ, Soares RB, Silva CHL, Paranhos HFO, et al. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. *Gerodontology*. 2010; 27(2): 297-302.
- 26- Davi LR, Peracini A, Ribeiro NQ, Silva CHL. Effect of overnight immersion in sodium hypochlorite and perborate solution. *Gerodontology*. 2011; 28(5): 103-9.
- 27- Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Pathol Med*. 1996; 25(8): 411-5.
- 28- Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: *Disinfection, sterilization and preservation*. Philadelphia: Lea & Fabiger; 1991. p. 187-93.
- 29- Estrela C, Lopes HP, Elias CN, Leles CR, Pécora JD. Limpeza da superfície do canal radicular pelo vinagre de maçã, hipoclorito de sódio, clorexidina e EDTA. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2007; 61(2): 117-22.
- 30- Feltrin PP. Estomatite protética: estudo da superfície interna da prótese total mucossuportada (microscopia de varredura) e da mucosa suporte (citológico, histopatológico, imunohistoquímico) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo - USP; 1989.
- 31- Feltrin PP, Tortamano N, Jaeger RG, Araújo VC. Estomatite protética: estudo da superfície interna da prótese total em microscopia eletrônica de varredura e da mucosa de suporte através de exame citológico, histopatológico e imunohistoquímico. *Rev Assoc Bras Odontol*. 1993; 1(1): 31-8.

- 32- Fernandes RA, Lovato-Silva CH, Paranhos HF, Ito IY. Efficacy of three denture brushes on biofilm removal from complete dentures. *J Appl Oral Sci.* 2007; 15(1): 39-43.
- 33- Fonseca P, Areias C, Figueiral MH. Higiene de próteses removíveis. *Rev Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2007; 48(3): 141-6.
- 34- Freitas-Pontes KM, Silva-Lovato CH, Paranhos HF. Mass loss of four commercially available heatpolymerized acrylic resins after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(2): 116-21.
- 35- Glass RT. The infected toothbrush, the infected denture, and transmission of disease: a review. *Compendium.* 1992; 13(7): 592-8.
- 36- Goiato MC, Castelleoni L, Santos DM, Gennari FH, Assunção WG. Lesões orais provocadas pelo uso de próteses removíveis. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr* 2005; 5(1): 85-90.
- 37- Hensten-Pettersen A, Wictorin L. The cytotoxic effect of denture base polymers. *Acta Odontol Scand.* 1981; 39(3): 101-6.
- 38- Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J.* 1988; 21(1): 89-99.
- 39- Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc.* 1992; 123(1): 46-51.
- 40- Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent.* 2000; 28(2): 61-7.
- 41- International Standard Organization. ISO 10993-5: 1992. Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. Gêneve: ISO; 1992.

- 42- International Standard Organization. ISO 10398-4:2007 Tests for cytotoxicity: effects and applies in vitro methods. Gèneve: ISO; 2007.
- 43- Jagger DC, Al-Akhanazam 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.
- 44- Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing: the best approach. *Br Dent J.* 1995; 17(8): 413-7.
- 45- Jean, JB. Reassussing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Rev Med Oral Pathology.* 2003; 95(1): 51-9.
- 46- Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007; 24(1): 52-7.
- 47- Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(3): 203-7.
- 48- Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins. Effect of water-bath and microwave postpolymerization heat-treatments. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(1): 340-4.
- 49- Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of time of storage in water on the cytotoxicity of denture base and relined acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2009; 40(2): 93-100.

- 50- Kazuo SD, Ferreira UCS, Justo KD, Rye OE, Shigueyuki UE. Higienização em prótese parcial removível. Rev Odontol Univ Cidade São Paulo. 2008; 20(2): 168-74.
- 51- Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. Dent Mater. 1990; 6(1): 13-6.
- 52- Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. Part 1. J Oral Rehabil. 2002; 29(2): 300-4.
- 53- kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A, Buzti BN. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. Part 2. J Oral Rehabil. 2002; 29(3): 129-37.
- 54- Lee HE, Wang CC, Wang JC, Chen CP. The effect denture cleansers and clening methods on the microflora of denture plaque. Kaohsivng-Hsueh Ko Hsueh. 1985; 1(2): 88-94.
- 55- Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. Part 1. J Prosthet Dent. 1994; 72(6): 644-50.
- 56- Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. Part 2. J Prosthet Dent. 1994; 71(2): 178-85.
- 57- Lemos MMC, Miranda JL; Souza MSGS. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. Rev Bras Patol Oral. 2003; 2(1): 3-10.
- 58- Lima EMCX, Moura JS, Gracia RCMR, Cury AADB. Avaliação dos materiais e métodos de higiene utilizados por paciente usuários de

- próteses removíveis em atendimento na clínica da FOP-UNICAMP. Rev Odonto Cienc. 2004; 6(1): 12-9.
- 59- Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2003; 29(9): 565-6.
- 60- Macêdo JAB, Barra MM. O estado da arte do processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados, em função do pH. Parte 1. Leite Derivados. 2002; 65(2): 26-30.
- 61- Macêdo JAB, Barra MM, Gonçalves L, Conrado GF. O estado da arte do processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados, em função do pH. Parte 2. Leite Derivados. 2003; 68(1): 67-75.
- 62- Marchini L, Montenegro FLB, Cunha VPP, Santos JFF. Prótese dentária na terceira idade. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2001; 55(2):83-7.
- 63- Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Odontologia para a terceira idade. Jornal CFO. 2011; 98(1): 6-7.
- 64- Mirhadi H, Abbaszadegan A, Ranjbar MA, Azar MR, Geramizadeh B, Torabi S, et al. Antibacterial and toxic effect of hydrogen peroxide combined with different concentrations of chlorhexidine in comparison with sodium hypochlorite. J Dent (Shiraz). 2015; 16(4): 349-55.
- 65- 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(3): 65-71.
- 66- Morgan TD, Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in constant depth film fermentor. J Appl Microbiol. 2001; 91(2): 47-53.

- 67- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(2): 55-63.
- 68- Neville BW, Damm DD, White DK. Atlas colorido de patologia oral clínica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 278-81.
- 69- Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *J Prosthodont*. 1999; 12(1): 153-9.
- 70- Nogaroto SL, Penna TCV. Desinfecção e esterilização. Parte 1. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2006; 75(1): 20-9.
- 71- Nogaroto, SL, Penna, TCV. Desinfecção e esterilização. Parte 2. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2006; 76(2): 23-8.
- 72- O'brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000; 267(17): 521-6.
- 73- Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. Part 1. *Int Endod J*. 2004; 37(1): 38-41.
- 74- Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. Part 2. *Int Endod J*. 2005; 39(2): 63-71.
- 75- Oliveira TRC, Frigerio MLMA, Yamada MCM, Birman EG. Avaliação da estomatite protética em portadores de próteses totais. *Pesqui Odontol Bras*. 2000; 14(3): 219-24.

- 76- Paranhos HFO. Experimentação clínica de um dentifrício específico para higienização de próteses totais [Tese de Doutorado] Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 1996.
- 77- Pereira-Cenci T, Cury AA, Censi MS, Rodrigues G. In vitro Candida colonization on acrylic resins and denture liners: influence os surfasse free energy, roughners, saliva and adhering bactéria. Int J Prosthodont. 2007; 20(3): 308-10.
- 78- Phillips I, Lobo AZ, Fernandes R, Gundara NS. Acetic acid in the treatment of supeficial wounds infected by Pseudomonas aeruginosa. Lancet. 1968; 13(6): 11-2.
- 79- Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of Candida albicans to denture-base materials with different surface finishes. J Dent. 1998; 26(1): 577–83.
- 80- Rizzon LA, Miele A. Determinação de acetoína e metanol em vinagres de vinho brasileiros. B Ceppa. 2003; 21(1): 159-68.
- 81- Rowe AHR, Forrest JO. Dental impressions: the probability of contamination and a method of disinfection. Brit Dent J. 1978; 145(6): 184-6.
- 82-Ryu M, Kobayashi T, Kawamukai E, Quan G, Furuta T. Cytotoxicity assessment of residual high-level disinfectants. Biocontrol Sci. 2013; 18(4): 217-20.
- 83- Sagripanti JL, Bonifacino A. Cytotoxicity of liquid disinfectants. Surg Infect. 2000; 12(1): 3-14.
- 84- Schmoeller R, Balbi M. Caracterização e controle de qualidade de vinagres comercializados na região metropolitana de Curitiba/PR. Curitiba: Visão Acadêmica; 2010. p. 201-9.

- 85- Sesma N, Laganá DC, Gil C, Morimoto, S. Capacidade de remoção do biofilme por meio de um produto enzimático para higienização de bases protéticas. Rev Pos-Grad. 2005; 12(4): 417-22.
- 86- Sesma N, Takada KS, Laganá DC. Eficiência de métodos caseiros de higienização e limpeza de próteses parciais removíveis. Rev APCD. 1999; 53(6): 463-7.
- 87- Sharbaugh RJ, Descontamination: principales of disinfection. Sterilization technology for the health care facility. Gerontology. 1997; 24(3): 21-8.
- 88- Sheridan PJ. Cytotoxicity of denture base resins. Int. J. Prosthodont. 1997; 10(1): 73-7.
- 89- Silva CH, Paranhos HF. Efficacy of biofilm disclosing agent and of three brushes in the control of complete denture cleansing. J Appl Oral Sci. 2006; 14(6): 454-9.
- 90- Silva CHL, Paranhos HFO, Ito IY. Evidenciadores de biofilme em prótese total: avaliação clínica e antimicrobiana. Pesqui Odontol Bras; 2002; 16(3): 270-5.
- 91- Silva ME, Silva FLH, Swarnakar R. Estudo da verificação dos efeitos das concentrações iniciais de etanol e ácido acético sobre a eficiência da produção de vinagre de vinho de caju. In: III Encontro Nacional de PósGraduação. Anais do II ENPG. São José dos Campos, São Paulo, UNIVAP, 2003.
- 92- Silva, PMB. Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilmes de *C. albicans* em resinas acrílicas termopolimerizáveis. Gerontology. 2009; 17(2): 78-86.

- 93- Silva RJ, Seixas ZA. Materiais e métodos de higienização para próteses removíveis. *Int J Dent*. 2008; 7(2): 125-32.
- 94- Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2008; 57(8): 966-73.
- 95- Souza JA; Reges RV. Soluções limpadoras de prótese – revisão de literatura. *Rev Bras Prot Clin Lab*. 2003; 51(6): 339-43.
- 96- Spealman CR. Monomeric methyl methacrylate. *Indust Med*. 1945; 28(4): 291-9.
- 97- Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent*. 2004; 32(3): 295-9.
- 98- Tang ATH, Li J, Ekstand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res*. 1999; 45(5): 214-22.
- 99- Tay LY, Jorge JH, Carlos IZ. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology*. 2011; 10(1): 67-72.
- 100- Turano JC, Turano LM. *Fundamentos da prótese total*. 6. ed. São Paulo: Santos; 2002.
- 101- Van-Reenen JF. Microbiologic studies of denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1973; 30(4): 493-505.
- 102- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Part 1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(1): 79-84.

- 103- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Part 2. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99(2): 108-14.
- 104- Villalta P, Lu H, Okte Z, Garcia-Godoy F, Powers JM. Effects of staining and bleaching on color change of dental composite resins. J Prost Dent. 2006; 95(2): 137-42.
- 105- Wagner B, Kern M. Clinical evaluation of removable partial dentures 10 years after insertion: success rates, hygienic problems, and technical failures. Clin Oral Investig. 2000; 4(2): 74-80.
- 106- Webb BC; Thomas CJ; Willcox MD; Harty DW; Kox KW. Candida associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Treatment of oral candidosis. Aust Dent J. 1998; 43(4): 244-9.
- 107- Weiner ML, Freeman C, Trochimowicz H, Gerlache J, Jacobi S, Malinverno G, et al. 13-week drinking water toxicity study of hydrogen peroxide with 6-week recovery period in catalase-deficient mice. ATLA. 2000; 38(7): 607-15.
- 108- Wennberg A. Cell culture in the biological evaluation of dental materials: a review. ATLA. 1986; 13(3): 194-202.
- 109- Wiegand C, Hipler UC. Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. J Pathol Med. 2008; 3(1): 328-35.
- 110- Wiest JM. Desinfecção e desinfetantes. In: Guerreiro M, Oliveira SJ, Saraiva D. Bacteriologia especial: com interesse em saúde pública e saúde animal. Porto Alegre: Sulina; 1984. p. 51-66.

- 111- Wu JG. Efficacy evaluation of lowconcentration of ozonated water in removal of residual diazinon, parathion, methyl-parathion and cypermethrin on vegetable. J Food Eng. 2007; 79(3): 803-9.
- 112- Zandim DL, Corrêa FOB, Sampaio JEC, Júnior CR. The influence of vinegars on exposure of dentinal tubules: a SEM evaluation. Braz Oral Res. 2004; 18(1): 234-41.

Autorizo a reprodução deste trabalho

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 05 de abril de 2016

PAULA MASETTI

