



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



*Delise Pellizzaro*

**Efetividade da escovação com diferentes agentes de  
limpeza de próteses na redução da viabilidade de  
biofilme in vitro de *Candida albicans***

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.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani**

**ARARAQUARA**

**2011**

**DELISE PELLIZZARO**

**Efetividade da escovação com diferentes agentes de limpeza de próteses  
na redução da viabilidade de biofilme in vitro de *Candida albicans***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Terezinha Giampaolo

3º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Helena Lovato da Silva

Araraquara, 25 de março de 2011.

# Dados Curriculares

*Delise Pellizzaro*

<b>NASCIMENTO</b>	10/09/1986 – Tapejara, Rio Grande do Sul
<b>FILIAÇÃO</b>	Glicerio Pellizzaro  Marilene Pellizzaro
<b>2004 a 2008</b>	Curso de Graduação na Universidade Estadual de Londrina – UEL
<b>2007 a 2008</b>	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Odontopediatria da Universidade Estadual de Londrina - UEL
<b>2009 a 2011</b>	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2009 a 2010</b>	Estágio docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

# Dedicatória

Aos meus maravilhosos pais **Glicerio e Marilene**, meu porto seguro. Agradeço pelo amor, carinho, confiança, apoio e por sempre apontarem o melhor caminho.

Apesar da distância, vocês nunca saíram do meu pensamento. Nos momentos difíceis era em vocês que eu pensava para poder superar os obstáculos, pois vocês são o maior exemplo de vida, o qual eu quero seguir.

Nos momentos em que conversávamos era para mim, um momento único, pois vocês conseguiam transmitir forças suficientes para eu poder superar os obstáculos e continuar a jornada.

A vocês, meus queridos pais, digo obrigado, simplesmente, porque não há uma palavra que expresse a proporção da minha gratidão.

Como agradecer as renúncias, a meu favor;

Os conselhos, lições e broncas, para que o meu caráter fosse formado sobre bons princípios;

A, sempre presente, certeza em minha capacidade, mesmo quando eu duvidava...

A vocês, meus amados pais, que me ensinaram que os sonhos não são bobagens e que lutar pela realização deles é o meu dever...

Como agradecer? Eu sei a resposta!

Vocês me dirão: Seja, em tudo, o melhor que puder ser, e isso nos bastará.

Obrigada por tudo!

As minhas irmãs **Daiane, Verônica e Valéria**, pela amizade, amor, carinho e companheirismo em todos os momentos felizes ou tristes de minha vida. Vocês, sem dúvida, foram o melhor presente que recebi dos nossos pais. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos meus avôs **Luiz e Severina** (em memória) e **Armelindo e Nair**, meus segundos pais.

Ao meu amor, **Edwin** que soube entender a minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei no mestrado. Pela ajuda, apoio, amor, companheirismo e por agüentar meus momentos de ansiedades e estresse. Nos momentos de desânimos era você quem me dava forças para erguer a cabeça e seguir em frente com coragem e determinação.

*“Amar não é olhar um para o outro, é olhar juntos na mesma direção”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

*Dedico este trabalho*

# Agradecimentos especiais

A **Deus**, por iluminar meu caminho e me dar forças suficiente para seguir sempre em frente em busca da felicidade.

A minha família **Glicerio, Marilene, Daiane, Verônica e Valéria** por compreenderem minhas escolhas, mesmo que isso me fizesse estar distante de vocês. Muito obrigado por sempre estarem ao meu lado durante toda essa jornada.

Ao meu namorado **Edwin...** Companheiro, amigo, conselheiro.

Obrigada por tornar os meus dias mais “alegres” e meus “problemas” mais leves.

A família do meu namorado que me acolheu como filha. A vocês o meu muito obrigado pelo amor, carinho, compreensão e amizade.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani** pela paciência, ajuda, amizade, confiança e por todo o conhecimento transmitido durante estes dois anos de mestrado. Com certeza foram os estímulos que me permitiram vencer as inseguranças ao longo dessa jornada.

Ao Professor **Gregory Polyzois**, por ter aceitado ser co-orientador e ter  
contribuído na elaboração e realização deste estudo.

A minha “pequena grande” amiga e companheira **Camila Zamperini  
(Camilinha)** pela amizade, companheirismo, ensinamento, paciência, pelas  
horas de conversa, pelas horas de laboratório juntas....enfim, muito obrigada por  
tudo. Você foi meu espelho durante todo o mestrado. Nossa amizade com  
certeza foi uma das melhores coisas que adquiri ao longo desses dois anos e  
com certeza levarei para a vida inteira. Adoro você!

A amiga **Paula**, pela paciência, amizade e ajuda na realização deste trabalho.  
Obrigada pelas horas sentada ao meu lado durante a escrita dessa dissertação.

A você posso dizer que, com certeza será uma excelente professora e  
orientadora, pois o tempo que convivemos juntas foi o suficiente para você  
provar isso.

A minha amiga **Fernanda Izumida**, primeira pessoa que me acolheu de braços  
abertos no início desta jornada. Muito obrigada pela paciência, amizade,  
conselho, ajuda e companheirismo ao longo destes dois anos.

A amiga **Karen** que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos.  
Obrigada por tornar meus dias mais alegres.

As minhas companheiras de apartamento **Mariana Andrade** e **Mariana Basílio**,  
pela ajuda, amizade e pela paciência nos momentos de estresse. Como diz o  
poema ...*“amigos são como anjos que nos ajudam a voar quando não  
conseguimos abrir as asas, são aquelas pessoas que nos ajudam a voar quando  
temos as asas machucadas, são aquelas pessoas que nos ajudam a encontrar o  
nosso caminho para o amor, felicidade e compreensão”* (Autor desconhecido).

Obrigado por tudo.

A **Stela**, técnica do laboratório de Microbiologia Aplicada, pela amizade, carinho,  
e ajuda prestada para a realização deste trabalho.

Aos professores da Prótese Parcial Removível **Prof. Dra. Ana Lúcia**, **Prof. Dra.**  
**Eunice** e **Prof. Dra. Ana Cláudia** pelo excelente convívio e ensinamento  
durante estes dois anos.

# Agradecimentos

Aos colegas de pós-graduação **Larissa, Giovana, Eduardo, Amanda, Diana, Juliana, Sabrina, Filipe, Patrícia, Cadu, Ana Lúcia, Ana Paula, Carol, Cris e Livia**. Por estarem ao meu lado durante toda a caminhada sempre dando forças para superar os obstáculos.

A técnica de laboratório **Sônia** pela ajuda e apoio recebido durante a realização deste trabalho.

A **Faculdade de Odontologia de Araraquara** por ter colaborado na minha formação.

Aos **professores do programa de pós-graduação** pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Aos **colegas** do laboratório de Microbiologia Aplicada, pelo excelente convívio durante as horas de trabalho.

Aos **Funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**  
pelo convívio agradável e amizade.

Aos **Funcionários da Biblioteca**, pela ajuda prestada durante a realização  
desse trabalho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES-**,  
pela bolsa concedida durante o mestrado.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela  
concessão de auxílio pesquisa, viabilizando a realização desse trabalho  
(processo 2010/06578-6).

E as demais pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização  
deste trabalho.

*"A persistência é o caminho do êxito."*

*(Charles Chaplin)*

# Sumário

Resumo.....	13
Abstract.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	24
3 PROPOSIÇÃO.....	73
4 MATERIAL E MÉTODO.....	75
5 RESULTADO.....	98
6 DISCUSSÃO.....	101
7 CONCLUSÃO.....	111
8 REFERÊNCIAS.....	113
Apêndice.....	124

**Resumo**

Pellizzaro D. Efetividade da escovação com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução da viabilidade de biofilme in vitro de *Candida albicans* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## Resumo

A *Candida albicans* tem sido considerada o principal agente etiológico da estomatite protética, uma das infecções mais comumente observadas em pacientes usuários de próteses removíveis. A adesão de *C. albicans* à superfície das próteses é o primeiro passo para o desenvolvimento da estomatite protética. Assim, uma adequada higienização das próteses é essencial para prevenir a formação de biofilme microbiano sobre a superfície protética e, conseqüentemente, o início e propagação desta infecção. O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da escovação com diferentes soluções (água destilada, dentífrico, digluconato de clorexidina a 2%, hipoclorito de sódio a 1% e Polident fresh cleanse<sup>®</sup>) na redução da viabilidade de um biofilme maduro de *C. albicans*, desenvolvido sobre uma resina termopolimerizável para base de prótese. Para isso, 90 corpos-de-prova circulares foram confeccionados, esterilizados e inoculados com uma suspensão de  $10^7$  células/mL de *C. albicans*. Para a formação do biofilme, todos os corpos-de-prova foram incubados por 48 h a 37 °C sob agitação. A seguir, os corpos-de-prova foram aleatoriamente divididos (n=9) e individualmente submetidos à escovação ou exposição por 90 s nas diferentes soluções avaliadas. Os espécimes imersos em água destilada pelo mesmo período de tempo foram utilizados como controle positivo. Para verificar a efetividade da escovação e dos agentes de limpeza, os corpos-de-

prova foram submetidos à avaliação da atividade metabólica das células não removidas de *C. albicans* por meio do teste do XTT. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ). A escovação com todos os agentes de limpeza apresentou redução significativamente superior ( $p<0,0001$ ) na viabilidade do biofilme quando comparada à exposição dos corpos-de-prova às soluções. Escovação e exposição em digluconato de clorexidina a 2% e escovação com hipoclorito de sódio a 1% resultaram em 100% de inativação do biofilme de *C. albicans*. Escovação e exposição nas demais soluções demonstraram, ao menos, 88% de redução na viabilidade celular ( $p<0,0001$ ). O método de escovação associado ao uso dos agentes de limpeza digluconato de clorexidina a 2% e hipoclorito de sódio a 1% provou ser efetivo para inativar biofilme maduro de *C. albicans* aderido em resinas acrílicas para base de prótese.

**Palavras-chave:** Placa dentária; *Candida albicans*; Estomatite sob Prótese; Escovação Dentária; Desinfetantes; Resinas Acrílicas.

**Abstract**

Pellizzaro D. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## Abstract

The adhesion of *C. albicans* to surfaces is the prerequisite for occurrence of denture stomatitis, a common disease diagnosed among denture wearers. Therefore, a strict routine of denture cleansing is essential to prevent biofilm formation on the acrylic denture surface and the onset of this infection. Thus, the aim of the current study was to investigate the effectiveness of combining toothbrushing and cleansing agents (dentifrice, 2% chlorhexidine gluconate, 1% sodium hypochlorite, and Polident fresh cleanse®) in inactivating *C. albicans* biofilm. Circular specimens (10 x 2 mm) of acrylic resin denture base material were made, sterilized, and individually inoculated with *C. albicans* ( $1 \times 10^7$  colony-forming units/mL). After incubation (37 °C/48 h), the specimens were divided into 10 experimental groups (n=9): 5 subjected to toothbrushing with different cleansing agents and 4 exposed to the cleansing agents without toothbrushing. Non-cleansed specimens were used as positive controls. The viability of cells was evaluated by XTT reduction method. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used for comparative analysis between the two methods of cleansing and the cleansing agents, respectively ( $\alpha=0.05$ ). Toothbrushing with all agents was significantly more effective ( $p<0.0001$ ) in reducing biofilm viability than exposure to the cleansing agents only. Exposure to all cleansing agents reduced significantly ( $p<0.0001$ ) the biofilm viability, with 2%

chlorhexidine gluconate being most effective ( $p < 0.0001$ ). Toothbrushing with 2% chlorhexidine gluconate and 1% sodium hypochlorite resulted in 100% inactivation of the biofilm. The use of cleansing agents as an adjunct to toothbrushing is an effective method to reduce *C. albicans* biofilm viability on denture base resins.

**Key Words:** Dental Plaque; *Candida albicans*; Stomatitis, Denture; Toothbrushing; Disinfectants; Acrylic Resins.

# Introdução

# 1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética é um tipo de candidose oral que acomete freqüentemente, os usuários de próteses removíveis<sup>2,47</sup>. Essa condição patológica caracteriza-se pela presença de inflamação na mucosa palatina, particularmente na área em contato com a superfície interna das próteses totais superiores<sup>58</sup>, podendo variar de múltiplos pontos hiperêmicos na mucosa palatina, a áreas eritematosas generalizadas e hiperplasia papilar no palato nos casos mais avançados de inflamação<sup>45</sup>. A elevada prevalência da estomatite protética em usuários de próteses removíveis tem sido demonstrada em vários estudos<sup>1,12,70</sup>. Abaci et al.<sup>1</sup> e Webb et al.<sup>70</sup> observaram a presença desta infecção em 24% a 60% dos pacientes usuários de próteses removíveis. Ainda, esta prevalência foi superior no estudo de Budtz-Jorgensen et al.<sup>12</sup> que diagnosticaram estomatite protética em 72% dos pacientes portadores de próteses removíveis, totais ou parciais. Apesar da etiologia multifatorial, a presença de *Candida* spp., principalmente *C. albicans*, no biofilme da prótese tem sido associada à patogênese da estomatite protética<sup>1</sup>. No desenvolvimento do biofilme, a adesão de *Candida* nas superfícies protéticas é seguida pela formação de colônias, secreção de polissacarídeos extracelulares, maturação e, finalmente, disseminação de microrganismos<sup>15</sup>. Assim, um protocolo de higienização das próteses deve ser estabelecido como um procedimento de rotina, com a finalidade de prevenir a formação de biofilme na superfície protética.

A literatura apresenta diferentes métodos para a higienização de próteses<sup>11,50,53,64</sup>. Métodos mecânicos, químicos ou a associação de ambos têm sido comumente recomendados. Entre esses métodos, a higienização com

escova dental e dentífrico tem sido a mais utilizada pelos portadores de próteses removíveis<sup>36</sup>. Segundo Paraskevas *et al.*<sup>52</sup>, esse método, quando corretamente utilizado, pode remover o biofilme por meio, principalmente, da ação mecânica da escovação. No entanto, é importante ressaltar que, apesar da escovação com dentífrico ser eficiente na remoção do biofilme<sup>50-52</sup>, tem sido demonstrado que a ação abrasiva do dentífrico durante este procedimento pode resultar em efeitos deletérios às resinas para base de prótese, como desgaste e aumento da rugosidade superficial<sup>25,39</sup>. Esses efeitos podem favorecer a adesão de microrganismos e a colonização de *C. albicans*, levando ao aparecimento da estomatite protética<sup>57</sup>. Assim, a utilização de agentes desinfetantes com menor ação abrasiva para os procedimentos de escovação tem sido indicada<sup>24</sup>.

Vários agentes de limpeza vêm sendo utilizados para a higiene das próteses. Nesse contexto, o digluconato de clorexidina é amplamente recomendado para a limpeza das próteses associado ao método da escovação<sup>11,53</sup>. Esse agente de limpeza, em forma de gel ou solução, quando usado em associação ao método da escovação, tem se mostrado efetivo na redução de biofilme oral<sup>8-9,20</sup> e cárie dentária<sup>30</sup>. Além disso, estudos verificaram que, em diferentes concentrações, a solução de digluconato de clorexidina demonstrou-se eficaz na inativação dos microrganismos *C. albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*<sup>29,62,64</sup>. Esses resultados foram observados após 5, 10, 15 min e 21 h de exposição ao agente de limpeza. Evidências de estudos clínicos demonstraram, ainda, a efetividade do digluconato de clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite<sup>8-9,20</sup> e estomatite protética<sup>6</sup>. A utilização de hipoclorito de sódio como agente

desinfetante também tem sido recomendada para higienização das próteses. Sua eficiência na inativação de várias espécies de microrganismos<sup>7,40,64</sup> tem sido observada<sup>13,40,64</sup>. Estudos prévios demonstraram a ação do hipoclorito de sódio na erradicação de *Candida*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Bacillus*<sup>13,49,62,64</sup>. É importante ressaltar que, em todos os estudos citados<sup>13,40,49,62,64</sup>, a efetividade do hipoclorito de sódio foi verificada após exposição à solução pelo método de imersão. No entanto, a efetividade antimicrobiana deste desinfetante em associação ao método de escovação ainda não foi relatada na literatura. Além dos agentes de limpeza citados, alguns detergentes comumente utilizados nos dentífricos têm demonstrado atividade antimicrobiana. Dentre eles, o lauril sulfato de sódio tem se destacado por apresentar excelentes propriedades detergentes e umectantes e, ainda, ser efetivo na redução da viabilidade de biofilme *in vitro*<sup>27-28,42,54,61</sup>. Além disso, evidências de estudos *in vivo* demonstraram que bochechos com lauril sulfato de sódio a 1% foi eficiente na redução do biofilme presente sobre a superfície dentária<sup>28</sup> e na redução de microrganismos presentes na saliva<sup>27</sup>. Em um desses estudos<sup>27</sup>, a efetividade da solução do lauril sulfato de sódio se manteve por até 7 h após o bochecho.

Apesar do amplo espectro de atividade antimicrobiana, vários inconvenientes tem sido relatados com a utilização de digluconato de clorexidina e hipoclorito de sódio para a desinfecção de próteses<sup>4,9,44,67</sup>. Soluções químicas à base de digluconato de clorexidina utilizadas para imersão ou em associação ao método de escovação podem alterar a dureza e a rugosidade superficial de algumas resinas acrílicas<sup>44,55</sup>, além de terem sido associadas com descoloração dos dentes naturais e artificiais, presença de manchas na língua e sabor

desagradável<sup>8-9,67</sup>. A utilização de solução de hipoclorito de sódio, efetiva para desinfecção, também pode ser limitada devido aos efeitos deletérios que esse agente pode ocasionar, como branqueamento de resinas para bases de prótese e efeito corrosivo em metal<sup>4,17,33</sup>. Além disso, estudos in vivo demonstraram que, após bochecho com lauril sulfato de sódio, os pacientes relataram algumas queixas e efeitos colaterais, como sabor desagradável<sup>28</sup>, sensação de queimação, descamação da mucosa e erosão<sup>28,41</sup>. Recentemente, um novo agente de limpeza de próteses (Polident fresh cleanse<sup>®</sup>) foi introduzido no mercado internacional. Comercialmente, esse agente se apresenta em forma de espuma e possui em sua composição lauril sulfato de sódio e ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Entretanto, não existem estudos na literatura avaliando o efeito antimicrobiano desse agente de limpeza para higienização de próteses. Nesse contexto, o Polident fresh cleanse<sup>®</sup> pode apresentar importantes vantagens em relação aos agentes de limpeza convencionais, particularmente por não conter partículas abrasivas em sua composição e possuir efeito antimicrobiano em um curto período de exposição (90 s) quando utilizado em associação com a escovação<sup>32</sup>.

Com base nessas considerações, o presente estudo avaliou a efetividade da combinação da escovação com diferentes agentes de limpeza (dentífrico, digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio e Polident fresh cleanse<sup>®</sup>), por um tempo curto de exposição (90 s), na redução da viabilidade do biofilme de *C. albicans*.

**Revisão da literatura**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Bassiouny et al.<sup>8</sup> (1975), realizaram um estudo avaliando o efeito da escovação com gel contendo digluconato de clorexidina a 1% na redução do índice de placa, índice de inflamação gengival, índice de cálculo e na profundidade de sondagem de bolsas periodontais em 49 pacientes portadores de próteses removíveis. Os participantes foram divididos em 2 grupos: GA: realizaram escovação com gel contendo digluconato de clorexidina a 1% nas primeiras 6 semanas e escovação com gel placebo nas 6 semanas seguintes; e GB: realizaram escovação com gel placebo nas primeiras 6 semanas, e nas semanas seguintes realizaram escovação com gel de clorexidina. Os pacientes foram avaliados antes, durante e após a finalização do experimento. Os resultados mostraram que, em relação ao índice de placa bacteriana e ao índice de inflamação gengival, houve uma redução estatística significativa com o uso do gel contendo clorexidina comparado ao grupo placebo. Entretanto, em relação ao índice de cálculo e profundidade de sondagem, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. No final do estudo, alguns pacientes relataram reações adversas ao uso da clorexidina, como manchamento nos dentes. Os autores concluíram que o uso da clorexidina foi efetivo na prevenção da formação de placa bacteriana e como agente terapêutico no tratamento da gengivite.

Backenstose, Wells<sup>4</sup>, em 1977, realizaram um estudo in vitro com o objetivo de avaliar o efeito corrosivo de diferentes agentes de limpeza sobre as estruturas metálicas. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova com três diferentes metais utilizados na confecção de próteses: níquel-cromo, alumínio e aço inoxidável. Os corpos-de-prova foram imersos em diferentes soluções

(Polident, Efferdent, Mersene, Clorox, Calgon-Clorox, Vinagre e água destilada) pelo tempo total de 240 h. De acordo com os resultados, 240 h de imersão em Polident, Efferdent e água destilada não causaram descoloração e efeitos corrosivos aos metais. No entanto, mudanças foram observadas no níquel-cromo após 8 h de imersão em Clorox e no alumínio após imersão de 8 h em Mersene e Clorox. As mudanças nos metais foram se intensificando no decorrer das 240 h de imersão, resultando em severos manchamentos nas amostras expostas ao Clorox e efeito corrosivo as amostras imersas em Mersene. Após 64 h de imersão em Calgon-Clorox, as amostras apresentaram características semelhantes das encontradas nas amostras expostas ao Mersene. Os autores concluíram que as soluções que apresentaram hipoclorito de sódio em sua composição (Clorox, Mersene e Calgon-Clorox) não podem ser utilizadas para higienização de próteses com metal, pois esta solução pode causar danos às estruturas metálicas.

No estudo de Bay et al.<sup>9</sup>, em 1978, o efeito da escovação com diferentes concentrações de clorexidina na prevenção do desenvolvimento de placa bacteriana e inflamação gengival foi avaliado. Além disso, foi verificada a correlação da intensidade de manchamento nos dentes com diferentes concentrações de solução de digluconato de clorexidina. Para isso, 15 estudantes com idade entre 20 e 24 anos participaram do estudo. O estudo teve duração de 180 dias e foi realizado em três períodos experimentais, com 60 dias para cada período. Os participantes foram divididos aleatoriamente entre 4 grupos: G1: escovação com digluconato de clorexidina a 0,15%; G2: escovação com digluconato de clorexidina a 0,10%; G3: escovação com digluconato de clorexidina a 0,05%; e G4: escovação com solução placebo (grupo controle). Os

participantes realizaram a escovação duas vezes ao dia, sendo que, em cada escovação, as escovas de dente foram imersas nas diferentes soluções 8 vezes. A intensidade da cor dos dentes, o índice de placa bacteriana e inflamação gengival foram avaliados clinicamente e através de fotografias tiradas no início, após 14, 30, 45 dias e no final de cada período de 60 dias. Os resultados mostraram que na avaliação após 45 dias, uma redução nos índices de placa e inflamação gengival foi observada para os grupos que realizaram a escovação com clorexidina quando em comparação ao inicial e ao dia 14. No final do experimento, não houve diferença estatística significativa entre os valores de índices de placa bacteriana e inflamação gengival para os grupos G1 e G2. Para o grupo G3, os índices de placa bacteriana e inflamação gengival foram superiores quando comparados aos grupos G1 e G2. No final do experimento, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram uma redução de 72%, 66% e 43%, respectivamente, no índice de placa bacteriana quando em comparação ao grupo controle, e de 57%, 47% e 10%, respectivamente, quando comparados aos índices de placa bacteriana aos 14 dias. Os valores médios de redução na inflamação gengival para os grupos G1, G2 e G3 foram 58%, 57% e 43%, respectivamente, em relação ao grupo controle e 36%, 34% e 12% em relação ao obtido aos 14 dias de experimento. As fotografias mostraram que a utilização de clorexidina nas concentrações de 0,15%, 0,10% e 0,05% causaram manchamento nos dentes e a intensidade das manchas foi diretamente correlacionada com a concentração da solução. Com estes resultados, os autores concluíram que o uso da solução de digluconato de clorexidina nas concentrações de 0,15% e 0,10% foi mais efetivo na redução do índice de placa bacteriana e inflamação gengival.

Budtz-Jørgensen, Knudsen<sup>11</sup>, em 1978, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a efetividade do digluconato de clorexidina a 1% e de uma solução comercial à base de peróxido alcalino (Steradent) na redução dos sinais clínicos da estomatite protética e na redução do biofilme de próteses. Um grupo de 74 pacientes com sinais clínicos de estomatite protética foi selecionado para o estudo. Inicialmente, uma nova prótese foi confeccionada para todos os pacientes. Em seguida, 4 diferentes grupos experimentais foram obtidos: A - escovação com gel de clorexidina a 1% (duas vezes ao dia), B - escovação com gel placebo (duas vezes ao dia), C - imersão da prótese na solução de Steradent, durante 15 min e D - imersão da prótese em solução placebo, durante 15 min. Os tratamentos tiveram duração de 1 mês. Os sinais clínicos da estomatite protética foram comparados antes e após o tratamento, por meio de fotografias do palato. Os resultados demonstraram uma melhora nas condições clínicas para todos os grupos experimentais. As próteses do grupo A apresentaram menor quantidade de biofilme sobre a superfície do que os demais grupos. Os autores concluíram que este estudo não fornece evidências de um efeito químico da clorexidina e do Steradent como um meio para evitar a formação de biofilme sobre a superfície da prótese. Os autores ainda afirmaram que, houve melhora nas condições clínicas para todos os grupos experimentais, não havendo diferença estatística significativa entre eles.

Nikaido, Vaara<sup>46</sup> realizaram um estudo em 1985 para descrever a ação do EDTA sobre a membrana bacteriana. Segundo os autores, o EDTA, quando entra em contato com a bactéria, causa alterações nos lipopolissacarídeos e altera sua membrana externa. Microscopia eletrônica de uma célula de *E. coli* exposta a solução de EDTA revelou que a membrana

externa da bactéria foi rompida facilmente e houve uma grande produção de ácidos graxos livres. Ainda, os autores sugeriram que a ação antimicrobiana do EDTA sobre os microrganismos parece estar relacionada a danos na membrana celular, causando aumento da permeabilidade da membrana e facilitando a ação de outros agentes antimicrobianos.

No estudo de Eoga et al.<sup>32</sup> (1987) a composição, os efeitos adversos, as indicações e os métodos de aplicação de um agente de limpeza em forma de espuma (Polident fresh cleanse<sup>®</sup>) foram descritos. De acordo com os autores, este agente de limpeza é composto por detergentes, como lauril sulfato de sódio, agentes quelantes, como EDTA, e água, apresenta-se na forma de espuma e possui ação antimicrobiana após escovação da prótese em 90 s. Ainda, este agente, quando associado ao método da escovação, pode reduzir cálculos, placa bacteriana e remover partículas de comida, manchas de comida, cigarros, chá e café. Os autores apontaram outra grande vantagem desse agente de limpeza: por não apresentar em sua composição partículas abrasivas, como a maioria dos dentífrícios. Não causa danos aos materiais para base de prótese.

Moran et al.<sup>43</sup> (1988), em seu estudo in vitro, avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes dentífrícios (Bocasan, Veadent, Colgate, Crest+, Gibbs SR, Macleans e Mentadent P) em *Streptococcus mitior*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacteroides intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga pchracea*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Moraxella catarrhalis* e *S. aureus*. Dentre os dentífrícios testados, 4 apresentam em sua composição o monofluorofosfato de sódio. Para a avaliação da CIM, 10 g de cada

dentifrício foram misturadas com 10 mL de água. Essa mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi diluído até chegar a uma concentração final de 1:1024 mL. Dois mililitros desta solução de cada dentifrício foram transferidos para um meio de cultura e incubados durante 24 h. Em seguida, inóculos dos microrganismos foram transferidos para as placas contendo os diferentes dentifrícios e incubados durante 72 h. Os autores observaram que os dentifrícios Bocasan e Veadent apresentaram valores de CIM elevados com atividade antibacteriana ausente ou reduzida. Esses dentifrícios não apresentam em sua composição o monofluorofosfato de sódio. Macleans, Gibbs SR e Colgate apresentaram valores de CIM semelhantes contra todos os microrganismos testados, sendo esses mais efetivos que os dentifrícios Bocasan e Veadent. Já o dentifrício Mentadent P apresentou excelente ação antimicrobiana, com os valores de CIM reduzidos, variando entre 0,19 e 0,78 g/l. Os autores observaram que o dentifrício Mentadent P apresentou a melhor ação antimicrobiana contra os microrganismos testados.

Jenkins et al.<sup>27</sup> (1991), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana do triclosan 0,2% como enxaguatório bucal em comparação ao lauril sulfato de sódio 1%, clorexidina 0,2% e a solução salina 0,9%, por meio da magnitude e a duração da redução da contagem das bactérias salivares. Participaram deste estudo 16 voluntários dentados e sem o uso de qualquer dispositivo intra-oral. Inicialmente, foi realizada uma coleta da saliva de cada paciente. Em seguida, os voluntários foram instruídos a realizar bochecho com 10 mL de cada solução, durante 1 min. Após o bochecho, saliva foi novamente coletada após 30, 60, 180, 300 e 420 min. As coletas foram agitadas, diluídas, plaqueada em meio de crescimento e incubadas (37 °C / 48

h). As unidades formadoras de colônias (ufc/mL) foram contadas e comparadas. Os resultados mostraram que as soluções de triclosan, lauril sulfato de sódio e clorexidina promoveram redução de ufc/mL por até 3 h para o triclosan e 7 h para a clorexidina e o lauril sulfato de sódio. A solução salina apresentou pouco efeito na redução dos valores de ufc/mL da saliva. Clorexidina, triclosan e o lauril sulfato de sódio foram mais efetivos que a solução salina. Clorexidina foi mais efetiva que o lauril sulfato de sódio após 180 min do bochecho. Após o experimento, os pacientes relataram sabor ruim com o uso do triclosan e do lauril sulfato de sódio. O lauril sulfato de sódio também causou sensação de queimação na boca dos voluntários. Com esses resultados, os autores concluíram que a duração da atividade antimicrobiana do lauril sulfato de sódio e do triclosan, mesmo em doses elevadas, é inferior àquela verificada para a clorexidina.

O efeito antimicrobiano dos dentifrícios, provavelmente, está relacionado à ação do lauril sulfato de sódio em sua composição. Recentemente, o triclosan foi adicionado à composição dos dentifrícios com o objetivo de se obter alguma ação antimicrobiana. Entretanto, existem poucos estudos avaliando seu efeito sobre os microrganismos. Dessa forma, Jenkins et al.<sup>28</sup> (1991), compararam o efeito antimicrobiano do bochecho com lauril sulfato de sódio a 1%, triclosan 0,2%, clorexidina 0,2% e da solução salina 0,9%. Participaram do estudo 16 voluntários dentados e sem o uso de qualquer dispositivo intra-oral. No primeiro dia do experimento, foi realizada uma coleta do biofilme da superfície dentária de cada paciente. Em seguida, os pacientes receberam uma profilaxia e foram instruídos a realizar bochecho com as soluções testadas durante 1 min, duas vezes ao dia, por 5 dias. Então, uma nova coleta do biofilme

foi realizada. Os autores observaram uma menor quantidade de biofilme após o uso da clorexidina quando comparada com a solução salina. O triclosan e o lauril sulfato de sódio apresentaram resultados semelhantes e mais efetivos que a solução salina na redução do biofilme. O bochecho com clorexidina apresentou melhores resultados na redução do biofilme que as demais soluções testadas. Após bochecho com triclosan e lauril sulfato de sódio, os pacientes relataram sabor ruim na boca. Além disso, o lauril sulfato de sódio causou sensação de queimação e erosão na mucosa de 7 voluntários. Os autores concluíram que apesar de o lauril sulfato de sódio e o triclosan apresentarem efeitos antimicrobianos, a ação da clorexidina ainda é mais efetiva.

Uma investigação para se avaliar os efeitos de diferentes agentes de limpeza na alteração de cor de diferentes resinas acrílicas (Lucitone CH, Tried Reline e Truliner) foi realizado em 1991 por McNeme et al.<sup>38</sup> Corpos-de-prova das diferentes resinas acrílicas foram confeccionados e divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: imersão em hipoclorito de sódio a 1%; imersão em Exspor; imersão em Cidex 2%; e imersão em Wescodyne-D. Diferentes tempos de imersão foram testados: 15, 30, 45, 60 min e 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 h. Outro teste foi realizado imergindo uma amostra de cada resina acrílica em hipoclorito de sódio a 5,25% durante 72 h. Nenhuma alteração de cor foi observada nas diferentes amostras submetidas à imersão em hipoclorito de sódio a 1% após 72 h. Na resina Lucitone, foi observada leve alteração da cor após 16 h de imersão em Exspor. Entretanto, os corpos-de-prova da resina Lucitone imersos em Wescodyne-D apresentaram uma leve alteração de cor após um período de 4 h de imersão e alteração moderada após 72 h. Para a resina Triad, nenhuma alteração foi observada após imersão em Cidex. No

entanto, os corpos-de-prova dessa resina apresentaram alteração da cor após imersão em Exspor e Wescodyne-D. Para a resina Truliner, a exposição dos corpos-de-prova em Exspor, Cidex e Wescodyne-D causou alteração de cor após 45 min, 2 e 72 h de imersão. Os autores concluíram que a resina acrílica Lucitone apresentou as menores alterações de cor. Nenhuma alteração de cor foi observada até 2 h de imersão, exceto para a resina Truliner. O agente desinfetante Wescodyne-D foi o que causou maior alteração de cor.

A manutenção da saúde bucal para pacientes hospitalizados, particularmente em pacientes imunocomprometidos, é de suma importância para a prevenção de infecções sistêmicas e orais. Assim, Epstein et al.<sup>20</sup> (1994) realizaram um estudo comparando a efetividade do uso de uma escova dental e uma escova de espuma imersa em clorexidina 0,2% no controle de placa bacteriana e na redução no índice de gengivite. Participaram deste estudo 27 indivíduos. Os participantes foram instruídos a mergulhar a escova de espuma antes da escovação em um copo contendo 15 mL de solução de clorexidina. Os procedimentos de higienização foram realizados duas vezes ao dia, durante duas semanas. Os participantes foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Pacientes do grupo 1 realizaram escovação com escova de dente tradicional e creme dental (1ª semana) e escovação com escova de espuma imersa em clorexidina (2ª semana). Pacientes do grupo 2 realizaram escovação com escova de espuma imersa em clorexidina (1ª semana) e escovação com escova de dente tradicional e creme dental (2ª semana). Os índices de biofilme e gengivite foram avaliados em seis diferentes sítios da cavidade bucal. Após o estudo, os autores observaram que a escovação com escova de espuma imersa em clorexidina a 0,2% foi tão efetiva quanto à escovação com escova dental

tradicional. Assim, foi concluído que a escovação com escova de espuma imersa em clorexidina é um método de higienização alternativo para pacientes hospitalizados.

Yoshida et al.<sup>71</sup>, em 1995, realizaram um estudo in vivo avaliando o efeito do EDTA na irrigação de canais radiculares. Foram preparados 189 dentes com problemas endodônticos e, após o preparo da porção radicular de cada dente, uma coleta da parede do canal foi realizada. Essa coleta foi incubada em meio de cultura durante 48 h. Em seguida, os dentes foram divididos em dois grupos: irrigação com EDTA a 15% e irrigação com solução salina, durante 1 min. Em seguida, papel absorvente foi inserido no interior do canal radicular e transferido para um meio de cultura por 48 h. Os canais radiculares foram obturados com guta-percha. Após uma semana, o material obturador foi removido, papel absorvente introduzido no canal radicular e transferido para um meio de cultura durante 48 h. Os autores observaram redução do número de microrganismos em 81,4% e 75% nos canais irrigados com EDTA e solução salina, respectivamente. Para as amostras coletadas após 1 semana, reduções de 72,1% e 35% foram observadas para EDTA e solução salina, respectivamente. O grupo tratado com solução salina apresentou uma porcentagem de redução de microrganismos significativamente menor quando comparada ao grupo exposto a solução de EDTA. Os autores concluíram que a irrigação de canais radiculares com EDTA foi o método mais efetivo na redução de microrganismos do interior de canais radiculares.

O objetivo do estudo de MacNeill et al.<sup>34</sup> (1997) foi comparar os efeitos in vitro da solução de digluconato clorexidina a 0,12%, sobre a *C. albicans* ao longo do tempo. Neste estudo, cepas ATCC de *C. albicans* foram

incubadas em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) por 48 h. Em seguida, as placas foram divididas em: Grupo 1 sem tratamento (grupo controle); e Grupo 2: amostras encobertas por 1 mm de clorexidina 0,12%. Todas as culturas foram incubadas por 10 dias e leituras para se verificar a viabilidade celular foram realizadas nos dias 2, 4, 6, 8 e 10. As leituras foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Na observação visual, o grupo controle apresentou viabilidade celular de 100% em todos os dias, enquanto que o grupo tratado com clorexidina apresentou redução de 30% na viabilidade celular no terceiro dia, 60% no quarto e 100% a partir do quinto dia. Na observação pela microscopia eletrônica de varredura, as colônias do grupo controle, em todos os dias, se apresentaram com tonalidades brancas, com aparência macia, úmida ou brilhante e formato ovóide levemente elevado. No grupo tratado com clorexidina, após o quarto dia, as colônias apresentaram-se em forma irregular e achatadas. No exame de microscopia eletrônica de transmissão, o grupo controle apresentou organização celular uniforme e o tratado com clorexidina, a partir do quarto dia, apresentou desorganização da membrana e organelas celulares, resultado de lise ou descamação. Os autores concluíram que o tratamento da doença periodontal pode ser realizado com irrigação ou enxaguatórios de clorexidina para evitar o crescimento de *C. albicans* e outros fungos.

O efeito da rugosidade de superfícies na retenção de *C. albicans* foi avaliado por Verran Maryan<sup>68</sup>, em 1997. Para isso, corpos-de-prova de polimetilmetacrilato (PMMA) e silicone com diferentes rugosidades foram contaminados com suspensões fúngicas de *C. albicans* padronizadas ( $1,29 \times 10^7$  células/mL). Após o período de adesão (1 h a 24 °C), os corpos-de-prova

contaminados foram cuidadosamente lavados, fixados com metanol por 1 min e corados. A contagem das células aderidas foi realizada em microscopia de fluorescência por meio da contagem de 10 campos e obtenção da média de células aderidas por unidade de área. Os autores observaram maior número de células nas superfícies rugosas quando comparadas às superfícies lisas do PMMA. Além disso, quando compararam as superfícies rugosas PMMA e do silicone, houve maior aderência ao silicone. Os autores concluíram que o aumento na rugosidade de superfície, seja nas superfícies de resina acrílica ou silicone, facilita a retenção fúngica.

Wade et al.<sup>69</sup> (1997) realizaram um estudo in vitro avaliando a ação antimicrobiana de diferentes dentifrícios com fluoreto estanoso em sua composição. Além disso, o potencial de manchamento desse componente sobre a resina acrílica também foi avaliado. Para avaliar o efeito antimicrobiano do fluoreto estanoso, 20 diferentes bactérias foram cultivadas em meio anaeróbico durante 48 h, e soluções padronizadas por meio da escala de Macfarlane foram obtidas. Uma alíquota das diferentes bactérias foi plaqueada e incubada com os diferentes dentifrícios (dentifrício 1 - fluoreto de sódio; dentifrício 2 - 0,4% de fluoreto estanoso; dentifrício 3 - 0,4% de fluoreto estanoso e 1% de pirofosfato estanoso; dentifrício 4 - 0,4% de fluoreto estanoso e 2% de pirofosfato estanoso; dentifrício 5 - 0,4% de fluoreto estanoso e dentifrício em gel 6 - 0,4% de fluoreto estanoso), durante 96 h, em condições anaeróbicas. Os resultados foram revelados em valores de máxima diluição inibitória. Para a avaliação do manchamento do fluoreto estanoso, corpos-de-prova de resina acrílica visualmente clara foram utilizados (Perspex). Os corpos-de-prova foram inicialmente imersos em saliva durante 2 min. Em seguida, foram lavados com

as diferentes soluções de água/dentifrício testados por 2 min e imersos em uma solução de chá por 60 min. Foram realizadas 10 repetições destes testes de manchamento. Os resultados demonstraram que todos os dentifrícios avaliados apresentaram efeito antimicrobiano para as diferentes bactérias avaliadas, exceto o dentifrício 6, que foi efetivo contra 10 das 20 bactérias testadas. Os resultados mostraram que os dentifrícios 1 e 5 apresentaram os melhores efeitos antimicrobianos, seguidos dos dentifrícios 2, 3, 4 e 6. Ainda, os autores relataram que o dentifrício 5 não causou manchamento à resina acrílica. As maiores alterações de coloração foram observadas após imersão nos dentifrícios 3 e 4. Os autores concluíram que o fluoreto estanoso apresenta ação antimicrobiana e que a associação de fluoreto estanoso com pirofosfato estanoso causou maior alteração de cor quando comparado apenas ao fluoreto estanoso.

Segundo Baysan et al.<sup>10</sup>, em 1998, materiais reembasadores resilientes são mais suscetíveis a adesão de microrganismos que os materiais de base de resina acrílica. Assim, o objetivo de seu estudo foi avaliar a efetividade da irradiação por micro-ondas na desinfecção de um material reembasador resiliente contaminado com microrganismos patogênicos. Corpos-de-prova (2 cm X 2 cm) de resina reembasadora resiliente (Molloplast-B) foram confeccionados e polimerizados em micro-ondas por 3 min a 650 W. Todos os corpos-de-prova foram esterilizados em autoclave, inoculados com os microrganismos testados (*C. albicans* ou *S. aureus*) e incubados aerobicamente a 37 °C. Após três dias de incubação, o meio de cultura foi descartado e os corpos-de-prova enxaguados cuidadosamente em 10 mL de solução de salina fosfatada tamponada (PBS) para remoção de células não aderentes. As

amostras confeccionadas foram divididas em quatro grupos (três experimentais e um controle) com dez amostras cada. Três grupos experimentais foram avaliados quanto aos procedimentos de desinfecção, sendo as amostras do grupo A submetidas à desinfecção em micro-ondas por 5 min a 650 W; as amostras do grupo B mantidas a seco em temperatura ambiente por 5 h; e as amostras do grupo C imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante a noite. Para o grupo controle, as amostras foram enxaguadas e deixadas em solução de PSB por 5 h a temperatura ambiente. A seguir, os corpos-de-prova foram individualmente colocados em tubos com 10 mL de PSB e agitados por 15 min. Diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) foram realizadas em placas com Agar Sangue, que foram incubadas durante a noite a 37 °C. Após a incubação, as colônias foram contadas e o número de ufc/mm<sup>2</sup> foi calculado. Os resultados demonstraram que, em relação ao tratamento por micro-ondas, a imersão em hipoclorito de sódio promoveu uma redução relativamente maior do número de microrganismos. Entretanto, apenas o grupo do procedimento a seco apresentou uma redução do número de células viáveis significativamente inferior em relação aos demais grupos. Os autores recomendaram a utilização das micro-ondas como um método de desinfecção, uma vez que o hipoclorito de sódio apresenta algumas desvantagens para utilização na clínica odontológica, sobretudo em longos períodos de imersão, como efeitos deletérios sobre as resinas acrílicas das próteses e corrosão de componentes metálicos.

Haselden et al.<sup>25</sup> (1998), em seu estudo in vitro, analisaram os efeitos de três diferentes dentifrícios abrasivos (Dentucreme ; Clinomyn e Colgate ), sobre três diferentes resinas base de prótese (Triad, Meliodent e Rapid Repair). Corpos-de-prova foram confeccionados com as diferentes resinas

testadas e submetidos a 30.000 ciclos de escovação com os diferentes dentífrícios testados. O desgaste nas amostras foi analisado através de microscopia eletrônica de varredura. A resina Triad apresentou o menor desgaste quando comparada com as demais resinas, com os 3 diferentes dentífrícios. O dentífrício Colgate não causou alterações na resina Triad, enquanto que o dentífrício Dentucreme e Clinomyn causaram alterações nesta resina. A escovação com os diferentes dentífrícios causaram alterações na resina Meliodent, sendo que os dentífrícios Dentucreme e Colgate apresentaram os maiores danos. A resina Rapid Repair apresentou os maiores desgastes quando comparada as demais resinas, para os 3 diferentes dentífrícios. Não foi observada alteração na superfície das diferentes resinas depois de escovadas com água destilada. Os autores concluíram que a resina Triad foi a mais resistente aos efeitos adversos causados pelos diferentes dentífrícios, seguida da Meliodent e Rapid Repair.

O objetivo do estudo de MacNeill et al.<sup>35</sup>, em 1998, foi investigar a ação da escovação sobre a remoção de microrganismos presentes sobre uma superfície (discos de Petri) e verificar os danos causados por este método sobre os microrganismos. Para isso, foram obtidos 3 grupos: grupo controle – sem escovação; grupo com escovação mecânica; e grupo com escovação com uma escova de dente elétrica. Um meio de cultura com o microrganismo *A. viscosus* foi cultivado overnight. Cada grupo de tratamento consistia de 10 corpos-de-prova (discos de Petri) contendo 5 mL da alíquota de *A. viscosus* cultivada. O ensaio da escovação foi realizado por 4 sucessivos intervalos de 15 s, totalizando 60 s de escovação. Após a escovação, os corpos-de-prova foram agitados e uma alíquota de 10 µL da solução foi diluída, plaqueada em um meio

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

Radford et al.<sup>57</sup> (1998) compararam a capacidade de aderência da *C. albicans* (isoladas ou presentes em saliva) em superfícies de uma resina acrílica termopolimerizável (Trevalon) e de dois materiais reembasadores (Molloplast B e Novus) com diferentes rugosidades superficiais. Para cada material, foram confeccionados 30 corpos-de-prova. Em seguida, as superfícies das amostras foram preparadas com diferentes instrumentos para se obter

diversos graus de rugosidade. O grupo controle foi formado por corpos-de-prova sem tratamento superficial. Uma suspensão de  $10^7$  ufc/mL de *C. albicans* foi utilizada para contaminar os corpos-de-prova, que ficaram incubados por 1 h com 1,75 mL dessa suspensão, no interior de placas de cultura. Após este período, os corpos-de-prova foram secos, montados em lâminas de vidro e corados. As leveduras e hifas aderidas foram contadas microscopicamente pela técnica de amostra estratificada. Para a contaminação dos corpos-de-prova com saliva não estimulada, foi utilizado material de 5 homens voluntários. A saliva foi centrifugada por 15 min, sendo o sobrenadante decantado, de forma a obter o clarificado de saliva que foi usado imediatamente para incubar as amostras da mesma forma anteriormente descrita. Os resultados demonstraram maior adesão aos materiais resilientes do que à resina acrílica. As superfícies rugosas apresentaram maior adesão que as superfícies sem tratamento de superfície. A presença de saliva reduziu consideravelmente a adesão. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os materiais. Para os autores, a redução da adesão em presença de saliva pode ser explicada pela presença da mucina e pelas propriedades antimicrobianas da saliva. Além disso, a saliva diminuiu o efeito da rugosidade superficial. Os autores concluíram que cuidados devem ser tomados quando da manipulação destes materiais, a fim de obter uma superfície o mais lisa possível, reduzindo a adesão microbiana.

Nikawa et al.<sup>48</sup>, em 1999, realizaram uma revisão de literatura sobre os métodos empregados para limpeza de próteses e fizeram algumas sugestões sobre os métodos de higiene empregados. Mais de vinte artigos avaliando a efetividade dos produtos para higienização das próteses foram analisados, bem como as vantagens e desvantagens de cada método. Os

autores comentaram que o método mais comum para o controle do biofilme diário é a higienização mecânica com escova (com ou sem sabão, pasta ou abrasivo). Entretanto, vários estudos relataram que a escovação pode causar desgaste da resina acrílica da prótese e que este método por si só pode ser insuficiente para reduzir o número de microrganismos. Dessa forma, os autores relataram que a utilização de soluções químicas é indispensável no cuidado diário das próteses. Dentre as soluções químicas utilizadas, os autores citaram: hipoclorito de sódio, peróxidos, peróxidos neutros com enzimas, ácidos, e enxaguatórios para próteses. Os autores ainda observaram as características dos estudos experimentais utilizando biofilme in vivo e in vitro. Os estudos in vivo apresentam resultados diferentes quando comparados aos estudos in vitro. Em primeiro lugar, a quantidade de biofilme in vivo difere de paciente para paciente, ao contrário do biofilme in vitro, onde a quantidade do microrganismo para a contaminação das amostras é padronizado. Além disso, diferenças em relação aos microrganismos encontrados nos biofilmes da cavidade bucal e in vitro foram relatadas pelos autores. Os autores concluem alertando que a avaliação da efetividade dos diferentes agentes de limpeza na redução do biofilme deve ser estudada tanto em biofilme in vivo como em in vitro, desde que ambos têm demonstrado diferentes características, grau de complexidade e resistência a agentes antimicrobianos.

Por meio de análise in vivo, a efetividade da desinfecção de próteses totais, com solução de clorexidina ou irradiação por micro-ondas, foi avaliada como método adjunto no tratamento de estomatite protética por Banting, Hill<sup>6</sup>, em 2001. Trinta e quatro pacientes portadores de próteses totais superiores com esfregaços positivos para pseudohifas de *C. albicans* foram

selecionados para um dos seguintes tratamentos: irradiação da prótese em micro-ondas ou imersão da prótese em solução clorexidina a 0,2% (controle). Todos os pacientes receberam medicação antifúngica tópica (Nistatina 300000 IU 3 vezes ao dia) por 14 dias. As próteses selecionadas para o tratamento com as micro-ondas foram escovadas com sabão anti-séptico e água e, então, irradiadas por 1 min a 850 W em três dias diferentes (1º, 5º e 10º dia). Para o grupo controle, as próteses foram imersas na solução de clorexidina durante a noite por 14 dias, com renovação da solução a cada 2 dias. Essas próteses também foram escovadas em 3 dias diferentes (1º, 5º e 10º dias), estabelecendo parâmetro para comparação entre os grupos. Os resultados demonstraram que, após 14 dias, 53% das próteses submetidas ao tratamento com micro-ondas apresentaram pseudohifas de *C. albicans* e que essa porcentagem aumentou para 84% para as próteses submetidas à imersão em clorexidina. Por outro lado, após esse mesmo período, os esfregaços citológicos referentes à mucosa palatina dos pacientes cujas próteses foram irradiadas apresentaram  $\frac{1}{4}$  do risco de infecção dos tecidos palatinos em relação aos pacientes que tiveram suas próteses imersas em clorexidina. Três meses após o tratamento, o grupo controle foi considerado cinco vezes mais susceptível a apresentar pseudohifas de *C. albicans*, quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com as micro-ondas. Os autores concluíram que a exposição das próteses às micro-ondas foi efetiva para uma adequada desinfecção das próteses, sem ocasionar efeitos deletérios aparentes em suas propriedades.

Em um trabalho de revisão de literatura, Calderone, Fonzi<sup>14</sup> (2001) descreveram os fatores de virulência da *C. albicans*. De acordo com os autores, a *C. albicans* é um patógeno comensal que se adapta bem a extremos

fisiológicos, além de ser capaz de atacar o hospedeiro sob diversas condições, como imunossupressão e traumas causados por próteses mal adaptadas. Os autores enfatizaram que qualquer falha ou redução nos mecanismos de defesa do paciente permite a ocorrência de candidíase. A *C. albicans* expressa diversos fatores de virulência que contribuem para sua patogênese, como presença de biomoléculas de reconhecimento do hospedeiro (adesinas), e produção de fosfolipases e proteases. Com relação à morfogênese, a *C. albicans* tem a capacidade de crescer sob duas formas: leveduras e filamentosas (hifas e pseudohifas). De acordo com os autores, a maioria das lesões ocorre na presença das duas formas de crescimento, sugerindo que ambas podem estar envolvidas nas fases de desenvolvimento e progressão da doença. Além disso, a capacidade de sofrer alterações fenotípicas frequentes, acompanhadas de alterações na expressão antigênica, morfologia de colônia e afinidade aos tecidos da *C. albicans* e outras espécies de *Candida*, favorecem a sua adaptação aos diferentes sítios de colonização. Os autores concluem que, por sua extensa capacidade adaptativa, a *C. albicans* sobrevive como comensal ou patógeno em diversos sítios e extremos fisiológicos e é a espécie de *Candida* com maior grau de virulência.

Tendo em vista o amplo espectro de atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, Estrela et al.<sup>21</sup> (2002) realizaram uma ampla revisão de literatura com o objetivo de discutir o mecanismo de ação desta solução a partir das suas propriedades físico-químicas e antimicrobianas. Segundo os autores, esta solução é capaz de promover alterações celulares biossintéticas, alterações no metabolismo celular, destruição de fosfolipídios pela formação de cloraminas, que interferem no metabolismo celular, pela ação oxidante, com inibição

enzimática irreversível nas bactérias, e pela degradação de ácidos graxos e lipídeos. Além disso, o hipoclorito de sódio é uma base forte ( $\text{pH} > 11$ ) e seu pH elevado pode alterar a integridade da membrana citoplasmática através de injúrias aos componentes orgânicos e ao transporte de nutrientes, ou por meio da degradação de fosfolipídios ou ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática. Esta reação causa alteração da biossíntese celular e danos irreversíveis à mesma, resultando em morte celular. Além disso, os autores relataram que o hipoclorito de sódio é recomendado pela maioria dos cirurgiões dentistas por ser, além de potente antimicrobiano, uma solução biocompatível em baixas concentrações.

Pavarina et al.<sup>53</sup>, (2003) avaliaram a efetividade de um protocolo de desinfecção para a higienização de próteses removíveis. Para isso, 32 pacientes portadores de prótese removível parcial ou total foram selecionados. Inicialmente, foi realizada uma coleta da prótese do paciente para verificar a presença de microrganismos em sua superfície. As amostras de biofilme coletadas foram incubadas e, após 24 h, a presença de microrganismos foi confirmada. Em seguida, todas as próteses foram limpas com digluconato de clorexidina a 4%, durante 1 min e lavadas com água destilada por mais 1 min. As próteses foram, então, aleatoriamente divididas em 4 grupos experimentais para imersão em diferentes soluções por 10 min: digluconato de clorexidina a 4%; hipoclorito de sódio a 1%; Biocida a 0,48%; e solução de Amosan a 3,78%. Após a desinfecção, as próteses foram imersas em água destilada e incubadas em meio de cultura durante 24 h. O crescimento de microrganismos foi avaliado pelo método da turvação do meio de cultura. Todas as próteses apresentaram redução significativa no número de microrganismos após os diferentes protocolos

de desinfecção, exceto para a solução Biocida, onde não foi observado inativação dos microrganismos. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina a 4% e o Amosan foram efetivos na redução de microrganismos presentes na superfície das próteses.

Barnabé et al.<sup>7</sup>, em 2004, realizaram um estudo in vivo avaliando a eficácia de sabão de coco e hipoclorito de sódio na redução da estomatite protética, *S. mutans* e *C. albicans*. Foram selecionados 28 pacientes portadores de próteses totais superiores e obtidos 2 grupos de estudo: grupo controle: os pacientes foram instruídos a realizar escovação das próteses com sabão de coco e sua imersão em água destilada durante 10 min; grupo experimental: os pacientes foram instruídos a realizar escovação das próteses com sabão de coco e sua imersão em hipoclorito de sódio a 0,05% durante 10 min. O experimento teve duração de 15 dias. Foram realizadas coleta de biofilme das próteses e avaliação da mucosa do palato segundo a classificação de Newton para verificação do efeito dos tratamentos, no início do experimento e ao seu final. Os dados mostraram que 19 dos 28 pacientes apresentaram lesões clínicas características de estomatite protética na primeira avaliação clínica. Inicialmente, 57,14% dos pacientes apresentaram elevadas taxas de *Candida* spp. associada a *S. mutans*. Após os tratamentos, somente 3 pacientes mostraram lesões características de estomatite protética e houve redução na quantidade de *C. albicans* e *S. mutans*, sem diferença significativa entre os dois grupos. Com isso, os autores concluíram que ambos os protocolos de limpeza instituídos provocaram redução significativa da estomatite protética, sem diferença entre os tratamentos.

Harrison et al.<sup>24</sup>, em 2004, avaliaram o efeito de várias soluções de limpeza na rugosidade superficial e sua efetividade na remoção de *C. albicans* de um material para base de prótese. Discos de uma resina de base de prótese foram confeccionados e a rugosidade superficial inicial foi avaliada. Quatro tipos de materiais para limpeza e água (controle) foram utilizados: creme dental convencional, creme dental com removedor de manchas, pasta de limpeza de prótese e solução de limpeza de prótese. Os corpos-de-prova foram escovados (15.000 ciclos) em máquina específica com carga de 200 g sobre as escovas, utilizando-se um dos cremes testados ou água. Os discos submetidos à ação da solução de limpeza de prótese foram imersos por 10 min, sendo então lavados e escovados em água. Após o ensaio, a rugosidade superficial de todos os discos foi mensurada. O efeito da escovação e da imersão na remoção de *C. albicans* foi realizado através da incubação de 13 discos. Para isso, os discos foram agitados vigorosamente por 15 s, inoculados em meio de cultura contendo o microrganismo e incubados. O efeito antimicrobiano dos agentes foi mensurado pela contagem do número de colônias. Não houve diferença estatística significativa na rugosidade superficial antes e após a escovação com água. Entretanto, as amostras escovadas com dentifrícios resultaram em superfícies mais rugosas. Não houve diferença de rugosidade entre o controle e a solução de imersão. A escovação com água não removeu todos os microrganismos presentes na superfície da resina. Nenhum microrganismo foi observado em todos os discos escovados com os diferentes dentifrícios, exceto para o Dentu-Creme (1:1) e o Steradent (1:2) onde foi observada uma colônia sobre a superfície da resina acrílica. Os autores concluíram que a limpeza dos discos com pasta ou imersão removeu quase todos os microrganismos que

recobriam as amostras, enquanto que a limpeza dos discos somente com água foi menos efetiva. Além disso, foi sugerida a limpeza por imersão como método de escolha, pois apresentou a mesma efetividade na remoção de detritos orgânicos, causando menores alterações superficiais por ser menos abrasiva.

Marchini et al.<sup>36</sup> (2004) realizaram um estudo avaliando a relação entre higienização das próteses e condições dos tecidos bucais de pacientes da Universidade de Mogi das Cruzes. Foram selecionados 236 voluntários que utilizavam próteses totais. Os pacientes responderam a um questionário e foram submetidos a um exame clínico. Foi constatado que, de todos os pacientes avaliados, 43,6% procuraram atendimento odontológico após 10 anos da última consulta e 22,9% procuraram atendimento odontológico após 6-10 anos da última visita ao dentista. Em relação à higienização das próteses, 77,5% dos pacientes afirmaram não ter recebido nenhuma instrução de higiene. Resultados semelhantes foram obtidos para a higienização da cavidade bucal, desde que apenas 22,9% dos pacientes receberam orientações. Em 42,4% dos pacientes foi observada a presença de estomatite protética. Porém, a maioria dos pacientes (89%) não apresentava nenhum tipo de sintomatologia. O método mais utilizado pelos pacientes para a higienização das próteses foi o método mecânico da escovação (98,7%). O método da imersão também foi relatado, porém, com menor frequência (27,1%). As soluções mais comuns para a imersão das próteses foram água/hipoclorito de sódio e água/bicarbonato de sódio. Os autores relataram ainda que houve uma relação significativa entre presença de estomatite protética e falta de higienização da prótese e mucosa oral.

Neppelenbroek et al.<sup>44</sup>, (2005) verificaram o efeito de desinfecções e armazenamento em água na dureza de resinas termopolimerizáveis. Corpos-de-prova cilíndricos foram confeccionados com os materiais Lucitone 550 e QC-20, polidos e mantidos em água destilada a 37 °C por 48 h. Doze mensurações de dureza em cada corpo-de-prova foram realizadas em microdurômetro equipado com diamante Vickers, sob carga de 50 g por 30 s. Em seguida, os discos foram desinfetados em solução de digluconato de clorexidina a 4% por 1 min, lavados em água e imersos por 10 min em uma das seguintes soluções: digluconato de clorexidina a 4%, hipoclorito de sódio a 1% e perborato de sódio a 3,78%. Estes tratamentos foram repetidos 4 vezes e, em seguida, as mensurações de dureza foi repetidas. O grupo controle foi mantido em água destilada por 56 min. Após as desinfecções, os corpos-de-prova foram mantidos em água destilada a 37 °C por 15, 30, 60, 90 e 120 dias e mensurações de dureza foram feitas em cada um dos intervalos. Os resultados demonstraram diferenças significantes na dureza em função do tempo. Também houve diferença significativa na interação resina de base e tempo. Quando as mensurações de dureza foram comparadas, uma diminuição na dureza foi observada após a desinfecção, independentemente da solução desinfetante utilizada. Entretanto, essa diminuição foi revertida após 15 dias de armazenamento em água. Não houve diferença significativa nos valores de dureza entre as amostras mantidas em água em todos os intervalos. Para ambas as resinas, um aumento contínuo foi observado na dureza até os 60 dias e, após este período, não foram notadas alterações. A resina QC-20 mostrou redução significativa nos valores de dureza quando comparada com a Lucitone 550, em todas as condições experimentais.

Azevedo et al.<sup>3</sup> (2006), avaliaram a dureza e a rugosidade de duas resinas reembasadoras (Kooliner e Duraliner II) e uma resina acrílica para base de prótese termopolimerizável (Lucitone 550) após imersão em soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio a 1% e clorexidina a 4%). A dureza e a rugosidade foram avaliadas uma hora após a polimerização dos materiais, após 48 h de armazenamento em água a  $37 \pm 2$  °C, após 2 ciclos de desinfecção (20 min), após 7 dias de armazenamento nas soluções desinfetantes e após 7 dias de armazenamento em água. A dureza de todos os materiais manteve-se inalterada após 2 ciclos de desinfecção. Após 7 dias de imersão em ambas as soluções, somente a resina Duraliner apresentou significativo aumento nos valores de dureza. As soluções não causaram efeito sobre a rugosidade de todos os materiais. O armazenamento em água por 7 dias resultou em aumento significativo na dureza para os materiais Kooliner e Duraliner (sem tratamento térmico). Para todos os materiais, o armazenamento em água não influenciou a rugosidade superficial.

Banin et al.<sup>5</sup>, em 2006, realizaram um estudo in vitro avaliando o efeito do EDTA e de um antibiótico (gentamicina) sobre um biofilme de *P. aeruginosa*. O biofilme foi formado sobre corpos-de-prova de policarbonato durante 24 h. Em seguida, as seguintes soluções foram adicionadas: EDTA a 0,1 a 50 mM; gentamicina 1, 10, e 50 g/mL; ou a combinação dos dois produtos. As placas contendo os corpos-de-prova foram novamente incubadas por 24 h. Os corpos-de-prova foram, então, transferidos para tubos contendo 1 mL de solução salina e agitados com o objetivo de desprender as células aderidas. O total de ufc/mL foi determinado através da diluição e plaqueamento em um meio de crescimento. Foi observada uma redução de 99% no número de células do

biofilme após tratamento com o EDTA. Entretanto, quando associado à gentamicina, inativação completa do biofilme foi obtida. O EDTA apresentou excelente ação antimicrobiana e sua associação com a gentamicina apresentou melhores resultados, inativando completamente o biofilme de *P. aeruginosa*.

A escovação é o método mais empregado para higienização de próteses removíveis. Porém, tem sido relatado que este procedimento pode causar danos à resina acrílica. Assim, Freitas et al.<sup>23</sup>, (2006) realizaram um estudo avaliando a resistência à abrasão de diferentes dentes de resina acrílica, com diferentes camadas de prensagem, frente a dentífrícios específicos e não específicos para higienização de próteses. O ensaio da escovação foi realizado em uma máquina de escovação, com escovas macias. Os corpos-de-prova foram confeccionados com diferentes marcas comerciais de resinas: Vipi-Dent Plus, Trubyte Biotone, Trilux, Ivostar e SR Vivodent PE. Para a realização do ensaio de escovação, foram utilizados os seguintes dentífrícios: Colgate, Bonyplus e Dentu-Creme. Água destilada foi utilizada como controle. O ensaio da escovação teve duração de 100 min. Os corpos-de-prova foram pesados em balança analítica antes e após os ensaios. As partículas abrasivas dos dentífrícios foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com os resultados, a média de perda de peso dos dentes foi 6,1 mg (Ivostar), 6,0 mg (Trilux), 5,9 mg (Trubyte), 5,8 mg (Vipi) e 5,3 mg (Vivodent), não havendo diferenças significantes entre esses valores. O dentífrício Colgate causou a maior perda de massa (10,1 mg), seguido pelo Dentu-Creme (7,6 mg). O Bonyplus foi o menos abrasivo (3,1 mg), sem diferença estatística em relação ao controle (2,4 mg). A MEV mostrou que o dentífrício Colgate apresenta partículas abrasivas em forma esférica, distribuição heterogênea e partículas

irregulares, enquanto que o Dentu-Creme apresenta forma regular, tamanho pequeno e distribuição homogênea das partículas. O dentifrício Bonyplus não apresentou nenhuma partícula abrasiva. Os autores concluíram que todos os dentes artificiais avaliados foram igualmente resistentes à abrasão, independentemente do número de prensagens, e que dentifrícios específicos para próteses totais geraram menos danos à superfície acrílica.

O efeito da imersão em soluções químicas sobre a rugosidade superficial de resinas acrílicas foi verificado por Lima et al.<sup>31</sup>, em 2006. Treze pacientes saudáveis foram instruídos a utilizar aparelhos removíveis contendo quatro corpos-de-prova em resina acrílica de rugosidade superficial pré-determinada (baseline). Os aparelhos removíveis foram, então, submetidos aos seguintes tratamentos: T1 (controle) – sem tratamento; T2 – solução comercial enzimática e T3 – hipoclorito de sódio a 0,5%. Além disso, os aparelhos foram imersos oito vezes ao dia em solução de sucrose 20%, com a finalidade de induzir a formação de biofilme. No quinto dia, a massa de biofilme formada foi determinada pela quantidade de proteína álcali extraída e a rugosidade superficial foi novamente mensurada. Novos aparelhos removíveis contendo novos corpos-de-prova foram confeccionados, de forma que todos os voluntários foram submetidos aos três tratamentos. A rugosidade da resina aumentou significativamente após os tratamentos, mas diferenças entre os agentes não foram estatisticamente significantes. A menor quantidade de biofilme formado nos corpos-de-prova de resina foi encontrada para o tratamento com hipoclorito de sódio 0,5%. Os dados obtidos sugeriram que a rugosidade da resina acrílica não foi alterada pelos agentes, mas a capacidade de remoção do acúmulo de biofilme depende do produto utilizado.

O efeito da escovação sobre a resistência à abrasão e a rugosidade superficial de materiais acrílicos foi avaliado por Mendonça et al.<sup>39</sup> em 2006. Os autores utilizaram três resinas rígidas para reembasamento (Kooliner, Duraliner II e Tokuso Rebase Fast) e uma resina termopolimerizável para base de prótese (Lucitone 550). Vinte e quatro corpos-de-prova de cada material foram confeccionados e divididos em três grupos: controle (não recebeu tratamento térmico pós-polimerização); tratamento térmico pós-polimerização em água a 55 °C por 10 min para as resinas de reembasamento e 60 min para a resina termopolimerizável; e tratamento térmico pós-polimerização com energia de micro-ondas na potência e tempo recomendados pelo fabricante de cada resina. Após os tratamentos, os corpos-de-prova foram escovados em máquina específica com solução de 1:1 de água destilada e dentifrício Colgate Bicarbonato de sódio, realizando-se 20.000 ciclos de escovação sob carga constante de 200 g. Antes e após o ensaio de escovação, os corpos-de-prova foram pesados até atingir massa constante e a rugosidade superficial foi mensurada. Os tratamentos térmicos pós-polimerização não melhoraram a resistência ao desgaste da superfície escovada, sendo que nos materiais Kooliner, Lucitone 550 e Tokuso Rebase Fast estes tratamentos resultaram em aumento da rugosidade superficial. A resistência ao desgaste na superfície escovada dos três materiais reembasadores não apresentou diferenças estatísticas significativas comparadas à resina termopolimerizável Lucitone 550. Os autores concluíram que a resistência ao desgaste dos materiais avaliados não foi melhorada com banho de água aquecida ou pelo tratamento pós-polimerização pela irradiação de micro-ondas. Os materiais Kooliner, Duraliner II e Tokuso Rebase Fast não apresentaram diferença estatística significativa na

resistência ao desgaste quando comparado a resina Lucitone. Para as resinas Kooliner, Lucitone, e Fast Rebase Tokuso, os tratamentos de pós-polimerização resultaram em aumento da rugosidade da superfície.

As bactérias crescem preferencialmente na forma de biofilmes, ou seja, aderidas a uma superfície e envolvidas por uma matriz de polissacarídeos. Nessas condições, as bactérias mostram-se mais resistentes à ação de qualquer agente antimicrobiano. Petersen et al.<sup>54</sup> (2006), realizaram um estudo com o objetivo de investigar a ação da combinação de fluoreto de sódio (NaF) e do detergente lauril sulfato de sódio na diminuição da formação de ácidos pelas células planctônicas e biofilme, bem como na diminuição da formação de polissacarídeo extracelular. Células planctônicas de *S. mutans* foram expostas durante 10 min às seguintes soluções: meio de cultura (controle); 2 mM NaF; 0,50 mM lauril sulfato de sódio ; 0,25 mM lauril sulfato de sódio; 2 mM NaF + 0,50 mM lauril sulfato de sódio; e 2 mM NaF + 0,25 mM lauril sulfato de sódio. Biofilme de *S. mutans* foi formado em placas de culturas de 24 orifícios durante 20 h. O biofilme formado foi exposto durante 5 min às mesmas soluções citadas acima. Além disso, os autores realizaram coleta de biofilme e saliva da cavidade oral de 39 pacientes. Em seguida, os pacientes foram instruídos a realizar bochecho com as diferentes soluções testadas e, após este bochecho, novas coletas foram realizadas. Foi observado um efeito inibitório sobre o *S. mutans* na formação de ácido, tanto em células planctônicas como em biofilme. No biofilme, o lauril sulfato de sódio isoladamente e em combinação com NaF reduziram a formação de ácido. A formação de polissacarídeo extracelular por *S. mutans* e na saliva foi reduzida quando utilizado o lauril sulfato de sódio isoladamente e em combinação com NaF. Com esses resultados, os autores concluíram que o

lauril sulfato de sódio em combinação com o NaF foram efetivos na redução da formação de ácidos e de polissacarídeos extracelulares *in vitro* e *in vivo*.

O objetivo do estudo de Robinson et al.<sup>61</sup> (2006) foi observar as mudanças na arquitetura de biofilmes da cavidade oral, após submetidos à exposição em agentes químicos, por meio de microscopia confocal. Um dispositivo foi fixado na superfície vestibular de molares de voluntários saudáveis e deixado na cavidade bucal durante 7 dias para a formação de biofilme. Depois desse período, os dispositivos foram levados para observação microscópica. Os biofilmes foram observados e a densidade da biomassa foi determinada de acordo com os valores padronizados: 1-4 biomassa de baixa densidade; 5-8 biomassa de média densidade; e maior que 9 biomassa de alta densidade. Então, o meio de transporte foi retirado e substituído pelos seguintes agentes químicos: cloreto de sódio a 0,9% e 9%; citrato de sódio; e lauril sulfato de sódio 0,25% (segundo os autores, esta concentração foi escolhida por ser semelhante à concentração encontrada nos dentífricos). Após exposição nesses agentes químicos, uma nova análise microscópica do biofilme foi realizada. Segundo os autores, a exposição do biofilme ao cloreto de sódio a 0,9%, não apresentou alterações na biomassa de baixa densidade e poucas mudanças foram observadas na biomassa de alta densidade. A solução de cloreto de sódio a 9% apresentou pequeno aumento na biomassa de baixa densidade e uma pequena diminuição da biomassa de alta densidade. A solução de citrato de sódio apresentou poucos efeitos sobre o perfil da biomassa dos biofilmes e a solução de lauril sulfato de sódio a 0,25% apresentou um aumento da biomassa de baixa densidade. Os autores concluíram que as soluções como o lauril sulfato de sódio podem servir como veículo para agentes antimicrobianos sobre os biofilmes.

Vários autores apontam o método da escovação com dentifício como o mais utilizado para higienização pelos portadores de prótese removível. Assim, Paranhos et al.<sup>51</sup>, em 2007, estudaram o efeito dos métodos mecânico e químico sobre a quantificação de biofilme de superfície interna de próteses. Pacientes portadores de próteses há mais de um ano, com acúmulo de biofilme na superfície interna da prótese, foram selecionados para o estudo. Os voluntários foram instruídos a realizar a limpeza da prótese de acordo com os seguintes métodos: 1. (grupo controle): lavagem da prótese com água após as refeições e sua imersão durante a noite em água; 2. Químico: lavagem da prótese com água após o café e almoço e sua imersão em solução de peróxido alcalino (Bonyplus) por 5 min após o jantar; 3. Mecânico I: escovação da prótese três vezes ao dia com escova dental macia (Johnson e Johnson) e dentifício (Dentu Creme) durante 2 min; 4. Combinação I: combinação entre o método 2 e 3; 5. Mecânico II: similar ao método 3, porém com uma escova de dente da marca Oral B com cerda macia; 6. Combinação II: combinação entre os métodos 2 e 5. Todos os voluntários realizaram os 6 métodos descritos, durante 7 dias cada método, em uma sequência aleatória. As próteses foram fotografadas antes e após cada método para avaliar a porcentagem de redução de biofilme. Todos os métodos testados apresentaram diminuição na quantidade de biofilme após o término do estudo. O grupo controle (lavagem com água) foi o que apresentou menor redução de biofilme quando comparado aos demais métodos. Os métodos 3 e 5, e o métodos 4 e 6, foram igualmente eficazes e superiores ao método 2. Os autores concluíram que o método mecânico (escovação) ou a combinação deste com um método químico de higienização foram os mais eficazes para a higienização das próteses.

Existem poucas evidências na literatura sobre o efeito adicional do creme dental na escovação mecânica para a remoção de biofilme. Assim, Paraskevas et al.<sup>52</sup> (2007) avaliaram o efeito adicional de um dentífrico sobre a eficácia da escovação. Trinta e seis pacientes com a presença de 5 dentes naturais por quadrante participaram do estudo. Os participantes foram divididos em 2 grupos: 1- escovação dos dentes com dentífrico (NaF) durante 2 min (30 s por quadrante, divididos em 15 s por vestibular e 15 s por lingual); 2- escovação dos dentes sem dentífrico, imergindo a escova apenas em água. Antes do início do estudo, os participantes foram instruídos a não realizar nenhum método de higiene oral 48 h antes da primeira avaliação. Passado este período, os participantes passaram pela primeira avaliação, onde foi realizada a coloração da placa bacteriana e os índices de placa bacteriana foram obtidos. Os participantes, então, ganharam uma escova de dente e foram instruídos a realizar a escovação com e sem dentífrico. No final do procedimento, a placa bacteriana remanescente foi novamente corada e os índices de placa anotados. Decorrido o período de 1 semana, os pacientes retornaram ao consultório e o mesmo procedimento de não realizar nenhum método de higiene oral 48 h antes da consulta foi adotado. Nesta consulta, nova avaliação da placa bacteriana foi realizada antes da escovação e os procedimentos foram repetidos nos dois grupos e, após a escovação, nova avaliação do índice de placa bacteriana foi realizada. Os resultados mostraram que a escovação com dentífrico resultou em uma média de redução da placa bacteriana de 50%, enquanto que a escovação com água reduziu a placa bacteriana em torno de 56%. A diferença obtida entre os dois grupos foi significativa. Segundo o autor, a razão para a menor redução de placa bacteriana no grupo de escovação com dentífrico pode estar

relacionado aos componentes deste dentífrico, como abrasivos ou detergentes. Esses componentes contribuem para uma diminuição da efetividade do dentífrico na remoção do biofilme. Dessa maneira, os autores concluíram que o uso de dentífrico não contribuiu para a remoção da placa bacteriana durante a escovação mecânica, tendo a ação mecânica fornecida pela escova dental sido o principal fator no processo de remoção da placa bacteriana.

A *C. albicans* tem a capacidade de se aderir facilmente a diferentes superfícies e formar biofilmes. Considerando essas informações, Ramage et al.<sup>58</sup> (2007) investigaram o efeito antimicrobiano do EDTA sobre biofilme de *C. albicans* formado em placas de 96 orifícios. Para isso, 1, 2 e 4 h após a adesão da *C. albicans* a superfície das placas, a solução testada em diferentes concentrações (0, 2,5, 25 e 250 mM) foi adicionada em cada orifício. Em seguida, as placas foram incubadas por mais 24 h a 37 °C. As características do biofilme foram avaliadas microscopicamente e a ação antimicrobiana da solução de EDTA foi observada através do ensaio de XTT. Os resultados revelaram que a formação do biofilme foi inibida pelo EDTA nas diferentes concentrações. Os autores observaram, ainda, que a incubação com a maior concentração de EDTA (250 mM) praticamente eliminou as células filamentosas de *C. albicans*, resultando em um biofilme menos complexo e de uma monocamada de células. Com as concentrações menores do EDTA (25 mM e 2,5 mM), os autores observaram a presença de tubos germinativos e filamentos mais longos. Assim, foi concluído que o EDTA foi eficaz na inativação do crescimento de microrganismos presentes no biofilme, uma vez que este agente inibiu as formas filamentosas de *C. albicans* e sua capacidade de formação de biofilme.

Por meio de um estudo *in vitro* realizado em 2008, Buergers et al.<sup>13</sup> compararam a eficácia de 10 métodos utilizados na desinfecção de próteses. Foram confeccionados corpos-de-prova de resina para reembasamento. Uma suspensão de *C. albicans* foi utilizada para contaminar todos os corpos-de-prova. Dez grupos foram obtidos por meio da imersão durante 10 min em cada um dos produtos: peróxido de hidrogênio 3%, hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído 2%, vinagre, Listerine Plax 0,3% (Triclosan) e perborato de sódio na forma de pastilha efervescente); irradiação em micro-ondas durante 6 min, com ou sem imersão em água durante a irradiação. Um grupo não submetido à desinfecção foi utilizado como controle positivo. A efetividade dos métodos foi avaliada através do método de intensidade da luminescência, sendo que para isso, 100 µL de adenosina trifosfato de bioluminescência foram adicionados em cada corpo-de-prova e mantidos durante 5 min. Após este período, a luminescência de cada amostra foi avaliada. Com base nos resultados, os autores observaram que não houve diferenças estatísticas significativas na desinfecção dos corpos-de-prova verificada no grupo controle quando comparada aos métodos de desinfecção com Plax, peróxido de hidrogênio, glutaraldeído, vinagre, Listerine e irradiação por micro-ondas a seco. Entretanto, houve diferença significativa na efetividade de desinfecção entre o grupo controle e a imersão do corpo-de-prova em perborato de sódio efervescente, hipoclorito de sódio e a irradiação por micro-ondas com os corpos-de-prova imersos em água. Dessa maneira, os autores concluíram que a utilização destes três métodos de desinfecção foi efetiva na redução da colonização de *C. albicans* nos materiais para base de prótese.

Uma das grandes preocupações hospitalares tem sido o aparecimento de infecções em feridas cirúrgicas de pacientes imunocomprometidos. Assim, alguns cuidados devem ser tomados para diminuir o risco deste tipo de infecção. Dentre esses cuidados, procedimentos de descontaminação das mãos e da pele têm sido citados. O uso do digluconato de clorexidina para anti-sepsia vem sendo bastante utilizado e relatado na literatura com o propósito de reduzir a propagação de bactérias resistentes a antibióticos. Dessa forma, DeBaun et al.<sup>18</sup>, em 2008, avaliaram as propriedades antimicrobianas da solução de digluconato de clorexidina a 2% sem álcool contra cepas de *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Para isso, foram avaliados a CIM e o tempo necessário para a erradicação dos microrganismos. As cepas utilizadas foram coletadas de pacientes, obtidas do fluxo sanguíneo de tecidos moles infectados. Essas cepas foram cultivadas e suspensões em concentração de  $10^9$  ufc/mL foram preparadas em solução salina estéril. Diluições da solução de digluconato de clorexidina foram preparadas: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1.024; 1:2.048 e 1:4.096. Uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana foi misturada junto a cada uma das diluições da solução. Em seguida, tubos de ensaios foram incubados em estufa a 35 °C por 16 a 24 h. O crescimento dos microrganismos foi avaliado por meio da turvação presente na solução após incubação. Para testar o tempo de inibição no crescimento das cepas, os microrganismos coletados foram preparados em salina estéril e uma alíquota de 0,1 mL desta solução foi misturada à solução de digluconato de clorexidina a 2% durante os seguintes tempos: 15 s, 1, 3, 6, 9, 12 e 15 min. Os resultados verificaram que a solução de digluconato de clorexidina a 2% sem álcool foi

efetiva e apresentou um tempo rápido de ação 3 min in vitro contra as cepas *A. baumannii* e MRSA. Ainda, a solução testada reduziu as colônias de bactérias em torno de 99% e, para todas as concentrações, atingiu esta ação antimicrobiana após três min de exposição ao produto. Para *A. baumannii*, a concentração de 1:2 inibiu o crescimento, enquanto que para MRSA, concentrações acima de 1:8 apresentaram inibição. Assim, os autores concluíram que a solução de digluconato de clorexidina a 2% sem álcool é um agente antimicrobiano eficaz contra *A. baumannii* e MRSA e que o produto oferece uma proteção adicional ao paciente contra esses microrganismos.

McCoy et al.<sup>37</sup> (2008) avaliaram os efeitos colaterais relacionados ao uso de digluconato de clorexidina por pacientes com doença periodontal. Nesse contexto, foi prescrito tratamento periodontal para os pacientes, incluindo lavagem subgengival com ultrassom e digluconato de clorexidina a 0,12%, bochecho com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%, 2 vezes ao dia, durante 4 meses, e ingestão de 100 mg de doxicilina por dia, durante 14 dias. Após o período de tratamento, os autores verificaram que 31,4% dos pacientes relataram efeitos adversos com o uso do digluconato de clorexidina. Os efeitos mais comuns foram alteração no paladar e manchas na língua, dentes e prótese. Feridas na boca, língua e garganta, falta de ar e chiado no peito também foram relatados, porém, com menor frequência. Com base nestes resultados, os autores concluíram que os pacientes que fazem uso do digluconato de clorexidina durante um período prolongado necessitam de uma monitorização cuidadosa. Ainda, foi sugerido que, se efeitos adversos começarem a se manifestar, o cirurgião dentista deve orientar ao paciente a interromper o uso desse agente para se evitar piores complicações.

Ainda no ano de 2008, Silva et al.<sup>64</sup>, avaliaram a efetividade de soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina a 2%, glutaraldeído a 2%, vinagre, tablete de perborato de sódio e perborato de sódio a 3,8%) na desinfecção de resina acrílica contaminadas com diferentes espécies de microrganismos (*C. albicans*, *S. mutans*, *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis*). Corpos-de-prova de resina acrílica foram confeccionados e, em seguida, distribuídos entre 10 grupos para o teste entre um microrganismo e uma solução desinfetante. Cada corpo-de-prova foi transferido para um tubo de ensaio contendo meio de cultura acrescentado do inóculo do microrganismo testado. Os tubos foram incubados por 24 h e, em seguida, cada corpo-de-prova foi imerso em 10 mL da solução testada. Os valores de ufc/mL foram, então, calculados. Foram observadas diferenças significantes nos valores de ufc/mL obtidos para *C. albicans* após a desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina a 2%, glutaraldeído a 2%, vinagre, e perborato de sódio a 3,8%. Não houve diferenças entre a contagem de microrganismos após desinfecção com tablete a base de perborato de sódio e o grupo controle. As soluções de perborato de sódio a 3,8% e vinagre foram mais efetivas que o tablete a base de perborato de sódio, porém menos efetiva quando comparada aos demais desinfetantes testados. Resultados similares foram observados para as soluções de hipoclorito de sódio, glutaraldeído e a clorexidina sendo efetivas contra os microrganismos testados. Os autores concluíram que hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído a 2%, digluconato de clorexidina a 2%, vinagre e perborato de sódio a 3,8% são alternativas válidas para a desinfecção de resinas acrílicas.

No ano de 2008, Van Strydonck et al.<sup>67</sup> realizaram um estudo avaliando a eficácia do uso da clorexidina durante a escovação no índice de placa bacteriana e sangramento gengival. Foram selecionados para a pesquisa pacientes sem problemas de saúde e que apresentavam no mínimo 18 dentes naturais. Três grupos de estudo foram obtidos. No primeiro grupo, os pacientes foram instruídos a realizar escovação sem dentífrico, duas vezes ao dia, com uma escova dental contendo um depósito para armazenamento de clorexidina (124 mg do produto em cada escova e a liberação de clorexidina durante a escovação era de aproximadamente 1,3 mg). No segundo grupo (controle), os pacientes realizaram apenas escovação sem dentífrico e clorexidina, duas vezes ao dia. No terceiro grupo, os pacientes realizaram escovação sem dentífrico, duas vezes ao dia, e bochecharam digluconato de clorexidina 0,2% durante 1 min, uma vez ao dia. O estudo teve duração de 6 semanas e os pacientes foram avaliados em três momentos: antes de iniciar o estudo, 3 e 6 semanas após seu início. Os tratamentos instituídos nos 3 grupos de estudo resultaram em redução significativa no índice de placa bacteriana. No terceiro grupo, o índice de placa foi inferior quando comparado aos outros dois grupos e não houve diferença estatística significativa em relação aos índices dos grupos 1 e 2. Em relação ao sangramento gengival, todos os grupos, ao final do tratamento, apresentaram redução do sangramento gengival quando comparados ao início do tratamento. No grupo 3 foi verificado o menor grau de sangramento, não havendo diferença em relação aos grupos 1 e 2. Os autores concluíram que o uso da clorexidina como solução para bochecho pós-escovação resultou em melhora no índice de placa bacteriana e sangramento gengival.

A presença de biofilme aderido sobre a superfície das próteses dentárias tem sido considerada o principal fator etiológico no aparecimento da estomatite protética. Considerando esses aspectos, Montagner et al.<sup>40</sup> (2009) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a efetividade antifúngica de diferentes agentes desinfetantes sobre amostras contaminadas com *C. albicans*. Para isso, 60 corpos-de-prova foram confeccionados com resina acrílica (Vipi Wave) e divididos em 5 grupos experimentais (n=10): G1: imersão em solução de clorexidina a 2% durante 10 min; G2: imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% durante 10 min; G3: imersão em hipoclorito de sódio modificado (50% v/v de hipoclorito de sódio 0,5% e álcool 96%) por 10 min; G4: imersão em Corega Tabs durante 5 min; e G5: imersão em peróxido de hidrogênio por 30 min. Após os processos de desinfecção, as amostras foram lavadas com solução salina e transferidas para tubos de ensaio contendo meio de crescimento, onde permaneceram durante 24 h. Em seguida, o grau de turbidez de cada meio de cultura foi avaliado para verificar a atividade antimicrobiana dos agentes testados. Também foi realizado um teste para verificar o crescimento celular. Neste, uma alíquota de cada tubo de ensaio foi transferida para uma placa contendo SDA e incubada por 24 h. Com os resultados, os autores observaram que houve diferença significativa entre os agentes testados. Os grupos G2, G3 e G5 não apresentaram diferença significativa entre si e foram mais eficazes que os grupos G1 e G4. Os autores concluíram que os agentes a base de hipoclorito de sódio e o peróxido de hidrogênio foram mais eficientes contra a *C. albicans* quando comparados a solução de clorexidina a 2% e o agente efervescente.

Um estudo avaliando o efeito de três métodos de higienização de próteses em biofilme formado em superfície de resina acrílica foi realizado em

2009, por Paranhos et al.<sup>50</sup> Para este estudo, corpos-de-prova de resina acrílica foram confeccionados e contaminados com diferentes microrganismos (*S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*). Após a contaminação, os corpos-de-prova foram distribuídos aleatoriamente (n=5) entre diferentes grupos de desinfecção. Grupo 1- método químico: os corpos-de-prova contaminados foram imersos em uma solução de água destilada e um tablete de peróxido alcalino por 5 min. Grupo 2- método mecânico: os corpos-de-prova foram escovados com escova dental de cerdas macias e dentifrício específico para prótese removível (Dentu Creme) por 20 s. Grupo 3- método combinado: os corpos-de-prova foram submetidos inicialmente ao método mecânico e, em seguida, ao método químico. Grupo 4- controle negativo: os corpos-de-prova desse grupo não foram contaminados, sendo apenas imersos em água destilada por 5 min. Grupo 5- controle positivo: os corpos-de-prova contaminados foram imersos em água destilada durante 5 min. Os resultados mostraram que os três diferentes métodos de higiene para próteses removíveis apresentaram efeitos diferentes, dependendo do tipo de biofilme formado sobre os corpos-de-prova de resina acrílica. O método combinado foi mais efetivo que o químico para *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, e igualmente eficiente ao mecânico contra *E. faecalis*. Para *E. coli*, o método mecânico apresentou resultados inferiores ao combinado, sugerindo que a imersão em solução de peróxido contribuiu para o efeito antimicrobiano deste método. Não houve diferença entre os métodos mecânico, químico e combinado para *S. aureus*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*. Nenhum dos 3 métodos testados conseguiu diminuir o nível de *S. mutans*. Os autores concluíram que os métodos combinados e mecânico são mais efetivos quando

comparados ao método químico para a desinfecção de resina acrílica contaminada com a maioria das espécies de microrganismos testadas.

Com o objetivo de avaliar os efeitos adversos causados por diferentes agentes de limpeza sobre os materiais para base de próteses, Pinto et al.<sup>55</sup> (2009) realizaram um estudo in vitro avaliando hipoclorito de sódio a 1%, 2% e 5,25%, glutaraldeído a 2% e digluconato de clorexidina a 4%. Corpos-de-prova circulares foram confeccionados com diferentes resinas acrílicas (Jet, Kooliner e Tokuyama Rebase Fast II) e divididos aleatoriamente em seis grupos de estudo: imersão em água, hipoclorito de sódio a 1% durante 10 min, hipoclorito de sódio a 2% durante 5 min, hipoclorito de sódio a 5,25% durante 5 min, glutaraldeído a 2% durante 10 min e digluconato de clorexidina a 4% durante 10 min. Foram realizados 30 ciclos de desinfecção para cada método e a rugosidade superficial e a dureza Knoop foram avaliadas em todos os corpos-de-prova, antes e após os procedimentos. O procedimento de imersão nos diferentes agentes desinfetantes reduziu a dureza de todas as resinas acrílicas avaliadas. Após a simulação de 30 ciclos de desinfecção, houve um aumento significativo da rugosidade superficial da resina Jet, independente do agente de limpeza utilizado. No entanto, a resina Kooliner apresentou uma redução significativa da rugosidade superficial para todos os agentes testados, exceto para o hipoclorito de sódio a 1%. A resina Tokuyama Rebase Fast II não apresentou alterações de rugosidades após 30 ciclos de desinfecção. Os autores concluíram que todos os agentes desinfetantes testados apresentaram alteração da dureza e rugosidade das resinas acrílicas.

O aumento da resistência aos anti-sépticos do *S. aureus* tem sido considerado um importante problema de saúde global. Dessa maneira, Sheng et

al.<sup>63</sup>, em 2009, realizaram um estudo avaliando a ação antimicrobiana do digluconato de clorexidina sobre o MRSA. Além disso, os autores avaliaram a resistência do MRSA a esta solução por meio da presença dos genes de resistência (*qacA/B*). Para este estudo, um total de 206 cepas de MRSA foram isoladas de pacientes e identificadas como MRSA. O teste de susceptibilidade do MRSA ao digluconato de clorexidina foi realizado através do método de diluição em Ágar. As concentrações do digluconato de clorexidina utilizadas para este experimento foram de 0,125 a 16 µg/mL. A extração do DNA da bactéria foi realizada utilizando uma matriz InstaGene. Uma colônia da bactéria foi suspensa em 1 mL de água destilada e centrifugada durante 1 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido, 200 µL da matriz InstaGene foram adicionados e foi realizada agitação da mistura por 23 min. O método de detecção do gene *qacA/B* foi feito pelo múltipla reação em cadeia da polimerase. Os autores observaram que 35% dos isolados utilizados neste estudo apresentaram alta resistência ao digluconato de clorexidina. Os valores de CIM obtidos variaram entre 2 e 8 µg/mL. Entre os 72 isolados de elevada resistência a clorexidina, 67 apresentaram o gene *qacA/B*. Os autores concluíram que é preciso ter cautela na indicação do digluconato de clorexidina como agente anti-séptico, pois como observado neste estudo, este agente pode apresentar resistência aos microrganismos como o MRSA.

No mesmo ano, Souza et al.<sup>66</sup> realizaram um estudo para avaliar o efeito do bicarbonato de sódio na adesão de *C. albicans* em resina acrílica, comparando com outras soluções desinfetantes mencionadas na literatura. Corpos-de-prova de resina acrílica termicamente ativada foram contaminados com *C. albicans* e incubados durante 24 h. A seguir, os corpos-de-prova foram

lavados com água destilada e divididos em 5 grupos (n=10), de acordo com as soluções desinfetantes testadas: Grupo controle - água destilada; Grupo B - bicarbonato de sódio a 5%; Grupo V – vinagre branco; Grupo C – Corega Tabs; e Grupo P – digluconato de clorexidina a 0.12%. Para a desinfecção os corpos-de-prova foram imersos durante 10 min em 10 mL da solução correspondente, de acordo com o grupo. As amostras foram, então, lavadas e agitadas em tubos de ensaio. As suspensões foram diluídas e plaqueadas para contagem de ufc/mL. Os grupos P e B apresentaram redução significativa nos valores de ufc/mL quando comparados ao grupo controle. Além disso, o grupo P apresentou redução microbiana significativa quando comparado aos grupos B, C e V. Os autores concluíram que a solução de digluconato de clorexidina a 0.12% apresentou o melhor resultado quando comparado com os demais produtos testados na redução da adesão de *C. albicans* na resina acrílica termicamente ativada. Contudo, a solução de bicarbonato de sódio a 5% pode ser uma alternativa viável para a higienização das próteses.

Abaci et al.<sup>1</sup> (2010), realizaram um estudo com o objetivo de comparar a incidência de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes portadores de três tipos de próteses com aquela verificada em indivíduos que não usam próteses. Além disso, avaliou-se a relação da estomatite protética com o tempo de uso da prótese, hábito de uso, hábito de higienização e gênero dos pacientes. O estudo contou com 30 pacientes portadores de prótese total, 30 de prótese parcial removível, 30 de prótese parcial fixa e 20 pacientes dentados totais. Os pacientes foram avaliados clinicamente antes do estudo em relação à presença de estomatite protética e de biofilme nas próteses. Esta avaliação foi realizada 2 h após a alimentação e a higiene dental. Em seguida, amostras foram coletadas

da saliva, mucosa do palato e dorso da língua de todos os pacientes. As amostras foram plaqueadas e incubadas durante 48 h. Procedimentos de identificação e quantificação (ufc/mL) foram, a seguir, realizados. Após a contagem das colônias, os pacientes foram classificados de acordo com o número de ufc/mL: 0= negativa;  $\leq 400$  ufc/mL = portador e;  $\geq 400$  ufc/mL = positivo. Nos resultados, verificou-se relação entre a quantidade de ufc/mL e a presença de estomatite protética. Na comparação da prevalência de estomatite protética com os tipos de prótese, a maior presença de estomatite protética (60%) foi verificada nos pacientes portadores de próteses totais, seguida por aqueles com próteses parciais removíveis (36,7%) e próteses fixas (16,7%). No grupo controle, todos os pacientes apresentaram mucosa saudável. Houve diferença estatística significativa na frequência de *C. albicans* isolada entre os pacientes com mucosa saudável (10,5%) e com estomatite protética (67,6%). Não foram encontradas relações significantes entre tempo de uso da prótese, hábito de uso, hábito de higienização e gênero dos pacientes com a presença/ausência de estomatite protética. Os autores concluíram que o uso de próteses totais ou parciais removíveis pode aumentar a prevalência de *C. albicans*.

A efetividade de diferentes agentes desinfetantes para a irrigação de canal radicular foi testado por Fidalgo et al.<sup>22</sup>, ainda no ano de 2010. Para o experimento, foi utilizado *S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*, padronizados por meio da escola de McFarland a uma concentração de  $10^5$  ufc/mL. As soluções irrigadoras testadas foram: ácido cítrico 6 e 10%, EDTA 17% e hipoclorito de sódio a 0,50%, 1%, 2,50%, e 5,25%. Para avaliar a ação antimicrobiana desses agentes, utilizou-se o teste de difusão em Ágar. Uma membrana de nitrocelulose

foi imersa nos diferentes agentes de limpeza e transferida para uma placa de Petri contendo os diferentes microrganismos avaliados. Em seguida, as placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C e os halos de inibição foram, então, medidos. Os resultados mostraram que o ácido cítrico nas diferentes concentrações não inibiu o crescimento de nenhum microrganismo testado. A solução de EDTA 17% não apresentou ação antimicrobiana para o *E. faecalis*, entretanto, apresentou halo de inibição para *S. aureus* e *C. albicans*, sendo mais efetivo contra a *C. albicans*. A solução de hipoclorito de sódio em concentrações mais elevadas (1%, 2,5% e 5,25%) apresentou atividade inibitória contra os microrganismos testados. O EDTA apresentou maior ação antimicrobiana que o hipoclorito de sódio a 0,5%, para a *C. albicans* e o *S. aureus*. O efeito do EDTA sobre a *C. albicans* foi semelhante ao demonstrado pelo hipoclorito de sódio a 1%, porém mais eficaz contra o *S. aureus*. As maiores concentrações de hipoclorito de sódio (2,5 e 5,25%) foram mais eficientes contra a *C. albicans* que o EDTA, contudo a ação antimicrobiana contra o *S. aureus* foi semelhante. Os autores verificaram, ainda, que a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio contra o *E. faecalis*, depende da dose da solução. Além disso, o hipoclorito de sódio a 5,25% foi letal para todos os microrganismos testados. Os autores concluíram que apenas o hipoclorito de sódio nas concentrações de 2,5% e 5,25% apresentou ação antimicrobiana ao *S. aureus*. A maior concentração da solução de hipoclorito de sódio apresentou os melhores resultados de ação antimicrobiana quando comparada com as demais soluções testadas.

No ano de 2010, Pisani et al.<sup>56</sup> analisaram a rugosidade superficial e a perda de peso de amostras de resina acrílica após o uso de diferentes dentífricos: um convencional (Sorriso) e três específicos para higienização de

próteses. Corpos-de-prova de resina acrílica (Plex Glass) foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n = 6), de acordo com o tipo de agente de limpeza utilizado para escovação: controle negativo (água); Sorriso; Corega Brite; dentifrício experimental 1 e dentifrício experimental 2. A escovação foi realizada em uma máquina de escovação com uma escova macia durante 300 min (106.8 ciclos), o que representa 6 anos de escovação. O peso das amostras foi medido inicialmente e após o período experimental. A rugosidade superficial dos corpos-de-prova foi mensurada após o período experimental. O grupo controle negativo apresentou a menor perda de peso. Os dentifrícios Sorriso e Corega Brite produziram perda de peso significativamente superior àquela observada para os dentifrícios experimentais 1 e 2, que não apresentaram diferenças significantes entre si. Com relação à rugosidade, o grupo controle negativo apresentou o menor valor e não foram encontradas diferenças significantes entre os dentifrícios Corega Brite, experimental 1 e experimental 2. O dentifrício Sorriso apresentou a maior alteração da rugosidade superficial. Os autores concluíram que, entre os dentifrícios testados, os experimentais 1 e 2 provaram ser os menos abrasivos e resultaram em menor perda de peso após a escovação dos corpos-de-prova. Além disso, os autores sugeriram a realização de avaliação adicional com base na capacidade destes dentifrícios em remover biofilmes.

Semenoff et al.<sup>62</sup> (2010), em seu estudo in vitro, analisaram a ação antimicrobiana de diferentes soluções (clorexidina a 2%, hipoclorito de sódio a 1% e paramonoclorofenol associado ao furacin) sobre as cepas de *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis* e *P. aureginosa*. Para a realização da fase experimental, placas de Petri contendo meio de crescimento foram

contaminadas com os diferentes microrganismos. Após 24 h de incubação a 37°C, discos de papéis absorventes imersos nos diferentes agentes desinfetantes foram posicionados sobre as placas de Petri. Após contato dos discos de 15 h (paramonoclorofenol associado ao furacin); 18 h (hipoclorito de sódio a 1%) e 21 h (clorexidina a 2%) com os microrganismos, todas as placas foram incubadas a 37 °C durante sete dias e os halos de inibição formados foram mensurados. Os resultados demonstraram que a clorexidina a 2% foi significativamente mais efetiva para todas as cepas microbianas em comparação às demais substâncias. O hipoclorito de sódio a 1% apresentou resultados intermediários e o paramonoclorofenol associado ao furacin obteve os piores resultados. Assim, os autores concluíram que a solução de clorexidina a 2% apresentou o melhor efeito antimicrobiano contra os diferentes microrganismos avaliados neste estudo.

**Proposição**

### 3 PROPOSIÇÃO

Com base nas informações obtidas da literatura, o objetivo desse estudo in vitro foi avaliar a efetividade da combinação da escovação com diferentes agentes de limpeza (dentifrício, digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio e Polident fresh cleanse<sup>®</sup>), por um tempo curto de exposição (90 s), na redução da viabilidade do biofilme de *C. albicans*.

## **Material e método**

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização da fase experimental do presente estudo, os seguintes materiais, instrumentos e aparelhos foram utilizados:

### 4.1 Materiais

1. Água destilada;
2. Acetona a 0,4 mM Qhemis, fabricada por F Maia, Cotia, SP, Brasil. Lote nº 32915;
3. Adesivo Super Bonder, fabricado por Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, São Paulo, Brasil;
4. Cloreto de sódio, fabricado por Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil; Lote nº 114358;
5. Creme Dental Colgate Máxima Proteção Anticáries, fabricado por Colgate Palmolive Co., Osasco, SP, Brasil; Lote nº 9285;
6. Cultura de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC number - 90028), Manassas, EUA;
7. Embalagens para esterilização em óxido de etileno, produzidas por ACECIL – Comércio e Esterilização a Óxido de Etileno Ltda, Campinas, SP, Brasil;
8. Escovas dentais da marca Colgate, do tipo macia, fabricada por Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil;
9. Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL;
10. Gesso pedra tipo III Herodent; fabricado por Vigodent SA Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

11. Isolante indicado para resina acrílica, marca Cel-Lac, fabricado por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
12. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, produzido por Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA. Cod 7143A. Lote nº 0007-101;
13. Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB) – Difco- Fabricado por Becton Dickinson/EUA. Lote nº 8351420;
14. Menadiona, produzida por Sigma Co., St. Louis, MO, EUA; Lote nº 065K0230;
15. Placa de cultura TPP com 24 orifícios estéril, embaladas individualmente, fabricada pela TPP, Trasadingen, Suíça;
16. Polident fresh cleanse<sup>®</sup> fabricado por GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Inc., Oakville, Ontario – Canadá; Lote nº 0639A1;
17. Pontas descartáveis para micropipeta, fabricadas por Axygen Scientific, Union City, CA, EUA;
18. Resina para base de prótese incolor Vipi Wave, específica para micro-ondas, fabricada por VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil; Lote nº 5485;
19. Silicona de condensação para inclusão de consistência pesada Labor Mass, fabricado por Vipi Ind. e Com. Ltda, Pirassununga, SP, Brasil; Lotes nº. 50560647 e 15681;
20. Solução de digluconato de clorexidina a 2%, fabricada por Deg Importação de produtos químicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil; Lote nº IFO71025;

21. Solução de hipoclorito de sódio 1%, fabricado por Labimpex Indústria e Comércio de Produtos para laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil; Lote nº 603379-RT;
22. XTT, fabricado por Sigma Co., St. Louis, MO, EUA; Lote nº 029K1600.

#### **4.2 Instrumental**

1. Alça de Drigalsky descartável, fabricada por Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
2. Alça descartável para inoculação de micro-organismos, Redplast Ind. e Com. de Embalagens Plásticas Ltda., Sarzedo, MG, Brasil;
3. Béquer graduado, fabricado por Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
4. Bico de Bunsen;
5. Buril de Le Cron, marca Duflex, fabricado por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
6. Caneta para retroprojektor, fabricada por Faber Castell, São Carlos, SP, Brasil;
7. Erlenmeyer graduado, fabricado por Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
8. Espátula de aço nº 36, marca Duflex, fabricada por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
9. Frasco de vidro com tampa para resina acrílica, fabricado por Jon, São Paulo, SP, Brasil;
10. Gral e espátula para gesso;
11. Micropipeta de 100-1000 µL, fabricada por Boeco, Alemanha;

12. Micropipeta de 1000-5000  $\mu\text{L}$ , fabricada por Boeco, Alemanha;
13. Micropipeta de 20-200  $\mu\text{L}$ , fabricada por Boeco, Alemanha;
14. Mufla termoplástica, fabricada por Dental Vipi Ltda. Indústria e Comércio de Importação e Exportação de Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil;
15. Pincel nº 6, fabricado pela Jon Comércio de Produtos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil;
16. Pipeta de vidro de 2 mL, fabricada pela Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
17. Pipetador de borracha, produzido por Nalgon Equipamentos Científicos Ltda, Itupeva, SP, Brasil;
18. Placas de Petri descartáveis 96 x 21 mm, fabricadas por TPP Techno Plastic Products AG, Suíça;
19. Placas de vidros jateados com óxido de alumínio (Vidroplan ACP Comércio de Vidros Ltda. Araraquara, SP, Brasil) com rugosidade de aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$ ;
20. Ponta Maxi-cut, fabricada por Labordental, São Paulo, SP, Brasil;
21. Tubos Falcon de 50 mL, produzido por Corning, NY, EUA.

### **4.3 Equipamentos**

1. Agitador de tubos orbital, fabricado por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil;
2. Autoclave vertical, fabricado por Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil. Modelo: AV 60. Nº. 6614;

3. Balança de precisão, fabricada por Gehaka Ind. e Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo, SP, Brasil. Modelo: BG 400 nº 016450;
4. Balança de precisão, fabricada por Gehaka Ind. e Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo, SP, Brasil. Modelo: BG 440 N° 1010;
5. Cabina de Segurança Biológica, fabricada por Grupo Veco, Campinas, SP, Brasil. Modelo: Bio Seg Classe II – Tipo A;
6. Centrífuga, fabricada por Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha. Modelo: 5810R;
7. Espectrofotômetro – Biospectro, produzido por Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil. Modelo: SP-220;
8. Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil. Modelo: MA 0324. Série: 9819911;
9. Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil. Modelo: MA 033. Série: 9819;
10. Filtro a vácuo, produzido por Fanem, São Paulo, SP, Brasil. Modelo: 089-CAL;
11. Incubadora de bancada shaker, fabricada por Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil. Modelo: Q816M20;
12. Leitora automática de microplacas de 96 poços, 405-750nm, oito canais, fabricada por Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China. Modelo TP Reader;
13. Máquina de ensaios para a realização dos testes de escovação, desenvolvida por MAVTEC Comércio de Peças, Acessórios e Serviços Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil;

14. Micromotor, fabricado por Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda, Joinville, SC, Brasil;
15. Micro-ondas de dupla emissão de ondas, produzido por Brastemp, Manaus, AM, Brasil. Modelo: Sensor Crisp 38 – DES (Doubled Emission System);
16. Prensa hidráulica PM 2000, fabricada por Vipi Delta, Pirassununga, São Paulo, SP, Brasil;

#### **4.4 Métodos**

##### **4.4.1 Confeção dos corpos-de-prova**

Para a presente pesquisa, foi utilizada a resina termopolimerizável Vipi Wave. Os corpos-de-prova foram confeccionados utilizando-se matrizes metálicas contendo cavidades circulares com 10 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade (Figura 1). Para a confecção dos corpos-de-prova, a resina acrílica foi incluída entre duas placas de vidros jateados com óxido de alumínio cuja rugosidade de aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$  simula a rugosidade encontrada na superfície interna de próteses<sup>73</sup>. Inicialmente, a parte inferior da mufla foi isolada e preenchida com gesso sobre o qual foi posicionada uma placa de vidro de forma e tamanho compatíveis com as dimensões da matriz metálica (Figura 2).



FIGURA 1 - Matriz metálica utilizada para confecção dos corpos-de-prova em resina acrílica.



FIGURA 2 - Parte inferior da mufla preenchida com gesso sobre o qual está posicionada a placa de vidro.

Após a presa do gesso, a matriz metálica foi isolada com isolante para gesso em ambos os lados. Em seguida, a matriz metálica foi fixada com três gotas de adesivo Super Bonder sobre a placa de vidro. Silicone de condensação foi manipulado e posicionado ao redor da matriz, para facilitar a sua remoção na fase de desinclusão (Figura 3). Outra placa de vidro foi fixada sobre a matriz com Super Bonder e a contra-mufla posicionada e preenchida com gesso de maneira convencional. Posteriormente à presa do gesso, a mufla foi aberta. A seguir, a resina foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante e, após o período de incorporação e homogeneização, a resina na fase plástica foi inserida nos orifícios da matriz. A mufla foi, então, fechada e o processo de polimerização em micro-ondas executado de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Forno de 500 W – 20 min com 20/30% de potência + 5 min com 80/100% de potência). Após o resfriamento à temperatura ambiente, a mufla foi aberta e os corpos-de-prova retirados, sendo os excessos laterais removidos com o auxílio de uma ponta estéril Maxi-Cut (Figura 4).

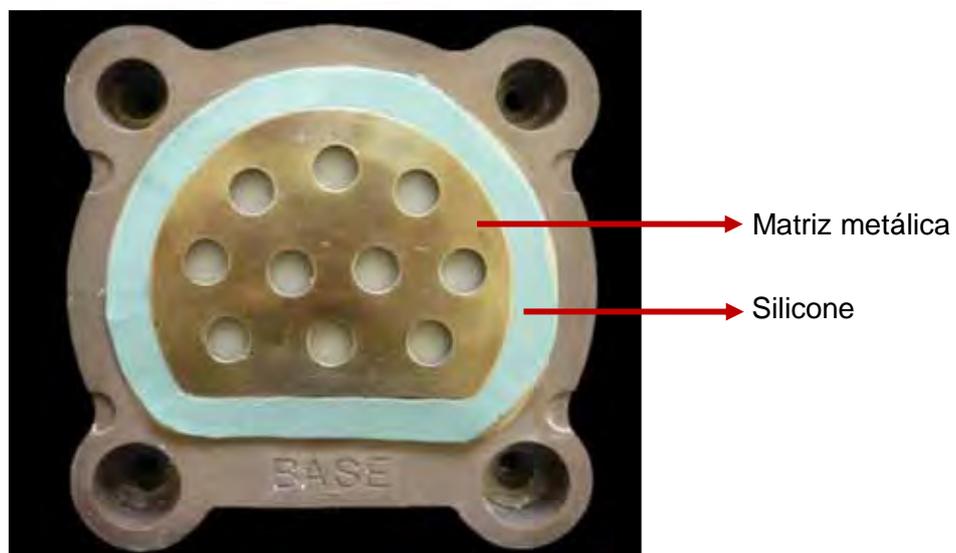


FIGURA 3 - Parte inferior da mufla preenchida com gesso sobre a qual está posicionada a placa de vidro e a matriz metálica com silicone ao redor.



FIGURA 4 - Corpo-de-prova em resina acrílica após o acabamento.

Os corpos-de-prova foram confeccionados dentro de condições assépticas, por um único operador, atuando sobre superfície de papel estéril, utilizando instrumental esterilizado, roupas de proteção, luvas, óculos e

máscaras descartáveis. Todos os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada a 37 °C por 48 h<sup>26</sup>.

#### 4.4.2 Esterilização das escovas de dente

Previamente à sua utilização, todas as escovas de dente foram seccionadas, de forma a restar somente às porções ativas (“cabeça” da escova). Em seguida, as escovas foram esterilizadas por meio de óxido de etileno, tendo este procedimento sido selecionado por ser considerado eficiente e seguro para a esterilização de polímeros<sup>50</sup> (Figura 5).



FIGURA 5 - Escova de dente esterilizada com óxido de etileno embalada individualmente.

#### 4.4.3 Esterilização dos corpos-de-prova

Previamente à sua contaminação, os corpos-de-prova foram esterilizados, individualmente, por meio de irradiação por micro-ondas durante 3 min a 650 W (Figura 6). Este método de esterilização mostrou-se efetivo para a esterilização de resinas para bases de prótese contaminadas por diferentes

microrganismos<sup>19</sup>, sem causar alterações nas propriedades mecânicas desses materiais<sup>60</sup>.



FIGURA 6 - Esterilização dos corpos-de-prova em micro-ondas.

#### **4.4.4 Microrganismo e condições de crescimento**

Para o preparo do inóculo, o microrganismo *C. albicans* ATCC 90028 foi semeado em placas de Petri sobre o meio de cultura SDA com cloranfenicol (Figura 7) e incubado a 37 °C por 48 h.



FIGURA 7 - *C. albicans* ATCC 90028 sobre o meio de cultura SDA com cloranfenicol.

A seguir, uma alçada da levedura recém cultivada (Figura 8) foi adicionada em um frasco contendo 20 mL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB) adicionado de glicose 50 mM. Após a incubação a 37 °C por 21 h, as células foram centrifugadas a 5.000 rotações por min em uma centrífuga, durante 5 min, e lavadas duas vezes com PBS estéril (NaCl 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,2) por meio de agitação e centrifugação a 5.000 rotações por min, durante 5 min.



FIGURA 8 - Alçada da levedura recém cultivada.

As células lavadas foram re-suspensas em 20 mL de caldo YNB 100 mM estéril. A densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL utilizando-se espectrofotômetro. Tem sido demonstrado que esta concentração celular é adequada para o desenvolvimento de biofilme de *C. albicans*<sup>16</sup>.

#### 4.4.5 Desenvolvimento do biofilme

O biofilme de *C. albicans* foi formado em placas de cultura pré-estéreis de 24 orifícios. Uma alíquota de 2 mL da suspensão celular fúngica padrão ( $1 \times 10^7$  células/mL) foi transferida para cada orifício contendo um corpo-de-prova e as placas foram incubadas por 90 min (fase de adesão)<sup>65</sup>. Durante esse período, as placas de cultura de células com os corpos-de-prova foram mantidas em um agitador orbital a 37 °C sob agitação de 75 rotações por minuto (rpm). Após o período de adesão, os corpos-de-prova foram lavados cuidadosamente com 2 mL de solução PBS estéril. Essa lavagem foi feita duas vezes com a função de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos.

Em seguida, 2 mL de YNB estéril adicionado de glicose 100 mM foram adicionados em cada orifício com o objetivo de fornecer mais nutrientes para os microrganismos e as placas foram mantidas a 37 °C sob agitação de 75 rpm durante 24 h. Decorrido esse período, as amostras foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS estéril. Após a lavagem, 2 mL de YNB estéril a 100 mM foram adicionados em cada orifício. As placas foram mantidas a 37 °C sob agitação de 75 rpm durante um período adicional de 24 h, totalizando 48 h de incubação.

#### 4.4.6 Grupos experimentais

Após a formação do biofilme de 48 h, os corpos-de-prova foram divididos aleatoriamente em 10 grupos de estudo (n=9). Os corpos-de-prova do grupo controle positivo foram imersos em água destilada durante 90 s. Cinco grupos foram submetidos ao método da escovação com os seguintes agentes de limpeza: água destilada; solução água/dentífrico - 1:1; digluconato de clorexidina a 2%; hipoclorito de sódio a 1%; e Polident fresh cleanse<sup>®</sup>, durante 90 s. Nos demais grupos experimentais, os corpos-de-prova foram submetidos à exposição por imersão nos seguintes agentes de limpeza: solução água/dentífrico (1:1); digluconato de clorexidina a 2%; hipoclorito de sódio a 1%; e Polident fresh cleanse<sup>®</sup>, durante 90 s, com o objetivo de avaliar a ação química destes agentes sobre o biofilme. Para o grupo controle negativo, um corpo-de-prova estéril foi adicionado à placa de cultura em cada ocasião realizada, permanecendo em contato apenas com o meio de cultura estéril durante 48 h.

#### 4.4.7 Ensaio de escovação

Estes ensaios foram realizados em uma máquina de escovação (Figura 9) com seis pontos de teste. Esta máquina apresenta duas bases horizontais acrílicas removíveis com três cavidades circulares em cada base, nas quais os corpos-de-prova foram posicionados durante os ensaios de escovação. Essas cavidades circulares (Figura 10) apresentam as mesmas dimensões dos corpos-de-prova, permitindo, dessa forma, o seu correto encaixe e apreensão durante os testes.



FIGURA 9 - Máquina de escovação utilizada para a realização dos ensaios de escovação.

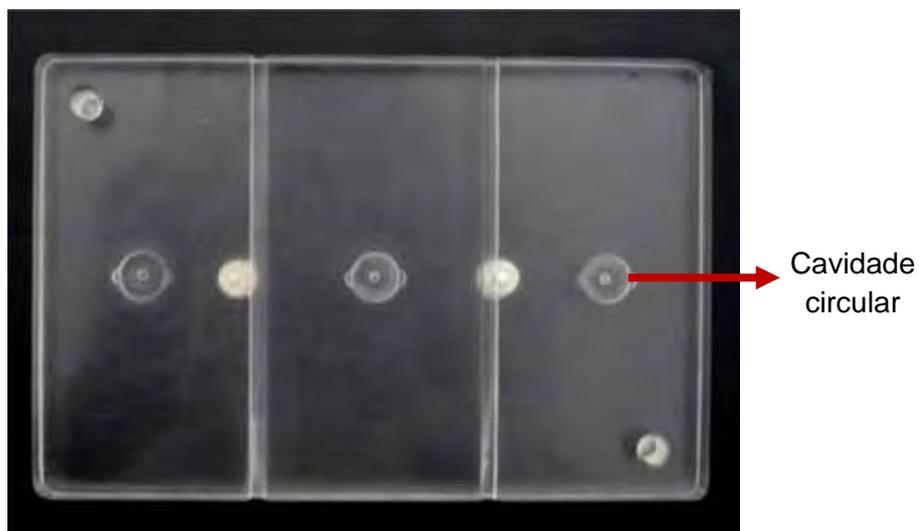


FIGURA 10 - Cavidade circular que permite o encaixe do corpo-de-prova durante a realização do ensaio de escovação.

As bases horizontais acrílicas ficam posicionadas no interior de dois compartimentos quadrangulares com uma parede metálica de 33 mm de altura (Figura 11). Esta moldura contorna as bases horizontais acrílicas, gerando

um compartimento que contem os agentes de limpeza permitindo, assim, que os corpos-de-prova permaneçam imersos durante a execução dos ensaios de escovação. Na parte central da máquina, encontra-se o motor unido a dois braços metálicos que acoplam 6 dispositivos metálicos (3 em cada braço), os quais permitem o encaixe das partes ativas das escovas dentais. Esses dispositivos apresentam, superiormente, pinos metálicos sobre os quais são colocados cilindros confeccionados em latão (Figura 12). A função dos cilindros é exercer força constante de 200 g sobre as porções ativas das escovas durante os testes de escovação<sup>39</sup>.

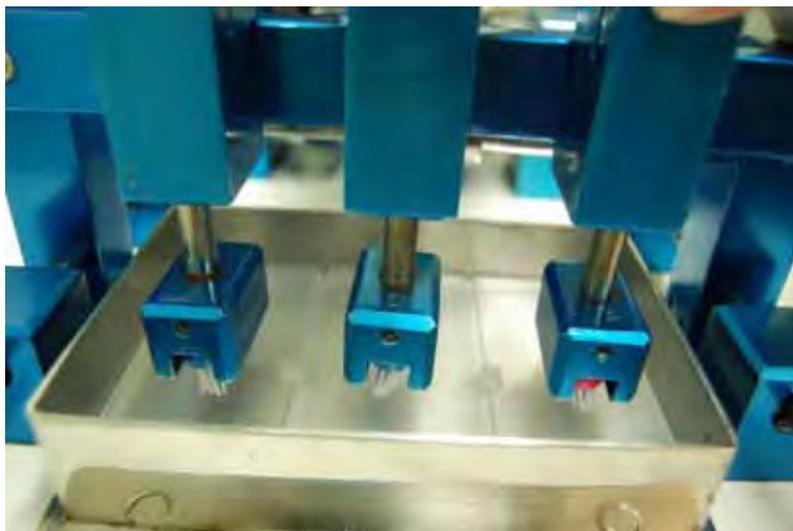


FIGURA 11 – Escovas dentais posicionadas e compartimento quadrangular com parede metálica de 33 mm de altura.

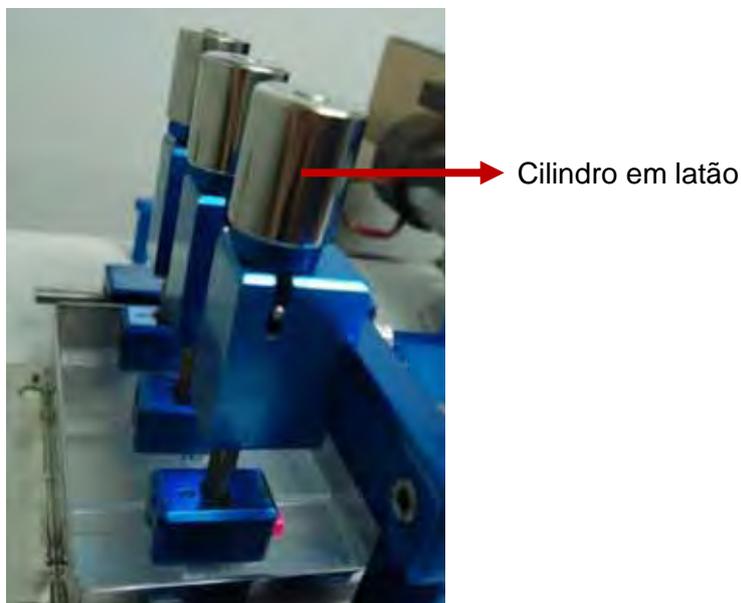


FIGURA 12 - Cilindros de latão que exercem força constante de 200 g.

O compartimento presente na base horizontal da máquina foi preenchido com 100 mL de cada agente de limpeza, sendo que, para cada produto testado, as escovas de dente foram trocadas e os dispositivos aos quais os corpos-de-prova estavam encaixados foram esterilizados em micro-ondas (3 min a 650 W). O acionamento do motor induziu a movimentação do conjunto braço metálico-dispositivo das escovas dentais, realizando movimentos cíclicos horizontais de amplitude controlada, permitindo um deslocamento linear das escovas de 18 mm para cada lado. Neste estudo, para cada ensaio, foram realizados 90 ciclos, o que corresponde a uma única escovação de 90 s. O ensaio da escovação foi realizado em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com raios ultravioletas durante 20 min.

#### 4.4.8 Protocolo de exposição aos agentes de limpeza

O protocolo de exposição aos agentes de limpeza foi realizado por meio da imersão dos corpos-de-prova nas soluções anteriormente descritas. Para isso, potes coletores universais estéreis foram preenchidos com 10 mL de cada solução testada e os corpos-de-prova foram imersos nas diferentes soluções, durante o período de 90 s (Figura 13).



FIGURA 13 - Corpos-de-prova imersos nas respectivas soluções testadas.

#### 4.4.9 Ensaio de XTT

Para a avaliação dos microrganismos não removidos ou eliminados após os procedimentos de limpeza, todos os corpos-de-prova foram submetidos ao ensaio de redução de 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT). O teste com XTT baseia-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de leveduras metabolicamente ativas converterem o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor

amarela) em um produto solúvel em água - formazana (cor laranja), o que é mensurado em espectrofotômetro. Para o ensaio, duas soluções foram utilizadas: solução de XTT e a solução de menadiona. A solução de XTT foi preparada utilizando-se água ultra pura a uma concentração de 1 mg/ml e mantido a -70 °C até o momento do experimento. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM, imediatamente antes da sua utilização<sup>72</sup>.

Todos os corpos-de-prova foram individualmente transferidos para novas placas de cultura de células estéreis com 24 orifícios. Em seguida, foram submetidos à dupla lavagem cuidadosa com 2 mL de PBS estéril. É importante ressaltar que essas lavagens foram realizadas com o objetivo de remover restos dos produtos utilizados durante a escovação. Posteriormente a lavagem, os corpos-de-prova contendo os microrganismos não removidos foram transferidos para uma nova placa de cultura com 24 orifícios contendo 2 mL da seguinte solução: 158 µL de PBS a 200 mM de glicose, 40 µL de solução de XTT previamente preparada e 2 µL de menadiona. As placas foram incubadas a 37°C por 3 h e, após esse período, a solução presente em cada orifício foi homogeneizada com uma pipeta. A seguir, uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para um ependorf e centrifugada a 5.000 rpm durante 2 min para a precipitação das células. Posteriormente, 200 µL do produto da degradação do XTT (sobrenadante) foram transferidos para o orifício de uma placa de leitura (Elisa) (Figura 14) e o resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro 492 nM.

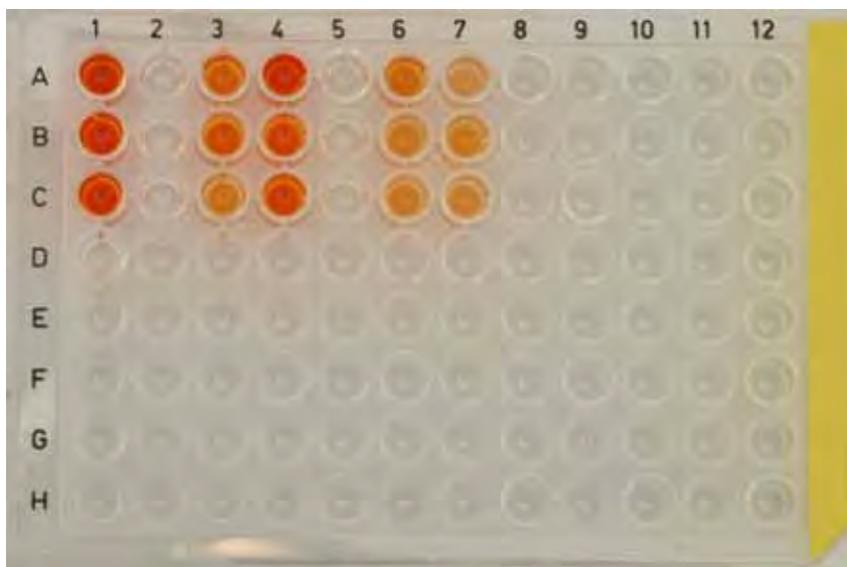


FIGURA 14 - Produto da degradação do XTT após 3 h de incubação em uma placa de Elisa para leitura em espectrofotômetro.

#### 4.5 Planejamento estatístico

Nesse estudo, dois fatores de variação foram estabelecidos: métodos de limpeza (escovação ou imersão) e agentes de limpeza (água, solução água/dentífrico, digluconato de clorexidina a 2%, hipoclorito de sódio a 1% e Polident fresh cleanse®). Todos os experimentos foram realizados em triplicata em 3 ocasiões distintas para cada associação entre método/agente de limpeza, totalizando 9 corpos-de-prova por grupo. Portanto, no total, 90 corpos-de-prova foram confeccionados para a realização da fase experimental desse estudo. O diagrama experimental do estudo está exposto na Figura 15.

Para se determinar a efetividade dos métodos e agentes de limpeza na redução da viabilidade celular do biofilme de *C. albicans*, foram mensuradas as porcentagens de redução (%) em relação aos valores de

absorbância obtidos do grupo controle positivo. Para a análise comparativa entre os dois métodos de limpeza (imersão X escovação), foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A avaliação quantitativa da efetividade de ambos os métodos com os diferentes agentes de limpeza na redução da viabilidade do biofilme de *C. albicans* foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. Adotou-se o nível de 5% de significância como regra de decisão para aceitar como significativa uma diferença entre as médias.

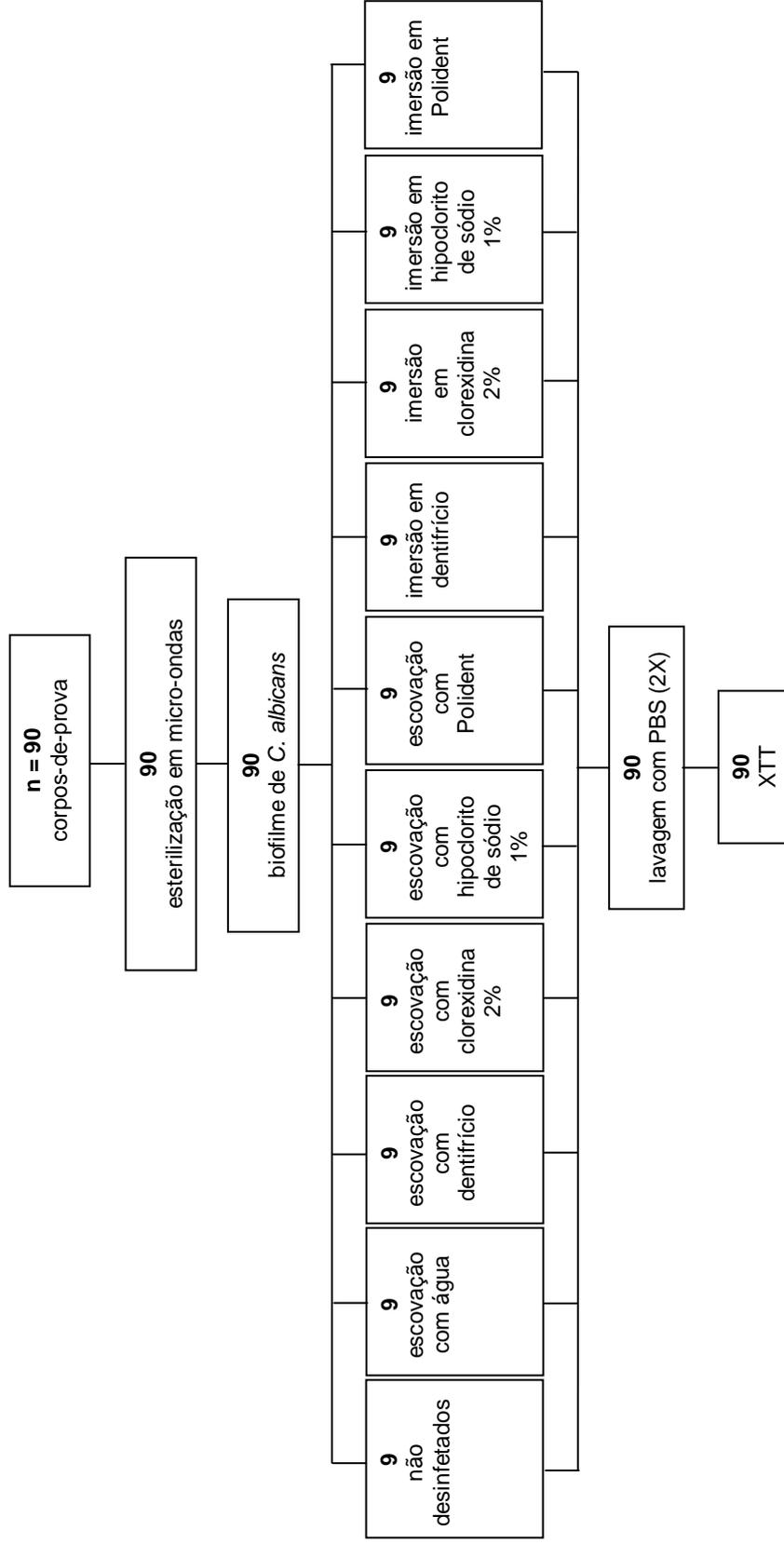


FIGURA 15 - DIAGRAMA EXPERIMENTAL.

**Resultado**

## 5 RESULTADO

Os valores de absorbância e a porcentagem de redução da viabilidade do biofilme de *C. albicans* para todos os grupos experimentais estão apresentados na Tabela 1. A média de absorbância (DO 492 nm) obtida no grupo controle positivo foi de 1,54. Ambos os métodos e todos os agentes de limpeza demonstraram uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ) na viabilidade do biofilme quando comparados ao grupo controle.

Quando os dois métodos de limpeza foram comparados, os resultados do teste Mann-Whitney demonstraram que, exceto para a solução de digluconato de clorexidina a 2%, a escovação com todos os agentes de limpeza foi significativamente mais efetiva ( $p < 0,0001$ ) na redução do biofilme de *C. albicans* do que a exposição dos corpos-de-prova aos mesmos agentes de limpeza. A solução de digluconato de clorexidina a 2% reduziu 100% da viabilidade do biofilme, independentemente do método de limpeza empregado.

Quando os agentes de limpeza foram comparados entre si, para cada método utilizado, o teste Kruskal-Wallis demonstrou que escovação com digluconato de clorexidina a 2% e hipoclorito de sódio a 1% resultaram na inativação do biofilme de *C. albicans* (100% de redução). Uma porcentagem de redução significativamente inferior ( $p < 0,0001$ ) foi observada nos grupos submetidos à escovação com água, solução água/dentífrico e Polident fresh cleanse<sup>®</sup>, não tendo sido observada diferença estatística significante entre esses grupos ( $p = 0,064$ ). Para os corpos-de-prova expostos aos diferentes agentes de limpeza, os resultados do teste Kruskal-Wallis demonstraram que exposição à solução de digluconato de clorexidina a 2% reduziu 100% da viabilidade celular do biofilme. Uma redução significativamente inferior ( $p < 0,0001$ ) foi observada

para os outros agentes de limpeza testados (solução água/dentifrício, hipoclorito de sódio a 1% e Polident fresh cleanse<sup>®</sup>), não havendo diferença estatística significativa entre estes grupos experimentais ( $p=0,117$ ). No grupo controle negativo, não foi observado crescimento de microrganismos ( $DO=0,000$ ).

Tabela 1- Valores das médias de absorbância (DO) e porcentagem de redução em relação ao controle positivo ( $DO=1.54$ )

Agentes de limpeza	Métodos de limpeza			
	XTT (DO)		%	
	Escovação	Imersão	Escovação	Imersão
Água	0.06	-	96 <sup>A</sup>	-
Dentifrício	0.03	0.17	98 <sup>Aa</sup>	89 <sup>Ab</sup>
Digluconato de clorexidina 2%	0	0	100 <sup>Ba</sup>	100 <sup>Ba</sup>
Hipoclorito de sódio 1%	0	0.19	100 <sup>Ba</sup>	88 <sup>Ab</sup>
Polident fresh cleanse <sup>®</sup>	0.03	0.16	98 <sup>Aa</sup>	90 <sup>Ab</sup>

\*No sentido vertical, valores com letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p>0,05$ )

\*No sentido horizontal, valores com letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes teste Mann-Whitney test ( $p>0,05$ )

**Discussão**

## 6 DISCUSSÃO

Os patógenos fúngicos mais importantes na etiologia da estomatite protética estão relacionados a espécies distintas provenientes do gênero *Candida*, especialmente a *C. albicans*. Esta espécie de *Candida* é considerada a mais virulenta<sup>14</sup> e tem sido relacionada à etiologia de, aproximadamente, 70% dos casos de infecções<sup>1</sup>. Um adequado protocolo de higienização da cavidade bucal e das próteses dentárias tem sido reconhecido e recomendado para a preservação da saúde bucal e a prevenção no aparecimento de infecções oportunistas, como a estomatite protética<sup>6,11</sup>. Dessa forma, o presente estudo avaliou a efetividade da escovação com diferentes agentes de limpeza na redução da viabilidade do biofilme de *C. albicans*.

A escovação de próteses dentárias é considerado o método mais comum<sup>36</sup> e efetivo na redução do biofilme acumulado<sup>52</sup>. Os resultados do presente estudo demonstraram que escovação com água reduziu em 96% da viabilidade do biofilme de *C. albicans*. Considerando que a solução de água destilada não apresenta efeitos químicos antimicrobianos sobre o biofilme avaliado, esta redução está relacionada à ação mecânica exercida pelas cerdas da escova em contato direto com o biofilme e às forças hidrodinâmicas de atrito, resultantes do fluxo de líquido durante o procedimento da escovação<sup>35</sup>. Dessa maneira, é provável que os resultados obtidos tenham sido consequência da exposição do biofilme celular a essas condições dinâmicas, resultando em sua ruptura mecânica. Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, Paraskevas et al.<sup>52</sup> também verificaram que a técnica de escovação com água foi eficiente na redução de biofilme acumulado sobre as superfícies dos dentes. No entanto, uma porcentagem de redução inferior (56%) foi verificada pelos

autores<sup>52</sup>. Esta diferença na porcentagem de redução do biofilme pode estar relacionada ao fato de Paraskevas et al.<sup>52</sup> terem avaliado biofilmes orais in vivo, enquanto que, na presente investigação, um modelo de biofilme in vitro foi utilizado. O biofilme oral in vivo possui um maior grau de maturação e complexidade e várias espécies de diferentes microrganismos, fontes de alimento e condições dinâmicas de crescimento estão presentes<sup>48</sup>. Isso pode ter aumentado sua resistência à ação mecânica da escovação. Dessa forma, é possível que uma menor porcentagem de redução de biofilme poderia ter sido obtida se um modelo mais complexo de biofilme tivesse sido utilizado no presente estudo. Essas observações demonstram a necessidade de se aumentar o poder antimicrobiano da técnica de escovação por meio da sua associação ao uso de agentes de limpeza, que agem diretamente sobre as estruturas celulares dos microrganismos, causando efeitos antimicrobianos irreversíveis<sup>21,34</sup>.

No presente estudo, a exposição dos corpos-de-prova aos diferentes agentes de limpeza reduziu aproximadamente 90% da viabilidade do biofilme de *C. albicans*. Outros estudos também verificaram a eficácia de diferentes agentes de limpeza na inativação de vários microrganismos, incluindo *C. albicans*<sup>31,40,53,64</sup>. No entanto, os melhores resultados foram obtidos quando a associação dos métodos mecânico e químico foi avaliada. A escovação dos corpos-de-prova com todos os agentes de limpeza demonstrou-se mais efetiva na redução da viabilidade do biofilme quando comparada à exposição dos corpos-de-prova aos produtos. Assim, um método de higienização de próteses utilizando escovação e um agente de limpeza pode ser indicado como o mais

efetivo para o controle de biofilme microbiano e a prevenção de infecções, como a estomatite protética.

No presente estudo, a efetividade da escovação com diferentes agentes de limpeza na redução do biofilme foi avaliada. Apesar de diferenças estatisticamente significantes não terem sido apontadas, os resultados obtidos demonstraram que escovação com dentifrício resultou em maior redução da viabilidade do biofilme (98%) quando comparada à escovação dos corpos-de-prova com água (96%). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que verificaram que a escovação com dentifrício foi efetiva na redução do biofilme<sup>50-52</sup>. A maior redução do biofilme obtida quando os corpos-de-prova foram escovados com dentifrício pode ser atribuída ao efeito antimicrobiano do dentifrício selecionado, que apresenta monofluorofosfato de sódio (1.450 ppm) e lauril sulfato de sódio em sua composição. Os efeitos antimicrobianos dos fluoretos parecem estar relacionados a alterações no metabolismo celular e à diminuição da acidogenicidade do biofilme<sup>43,69</sup>. Detergentes como o lauril sulfato de sódio também apresentam várias funções antimicrobianas, incluindo a remoção do material orgânico presente sobre as superfícies dos dentes e ação inibitória no processo de formação do biofilme<sup>27-28,54</sup>. No presente estudo, a exposição dos corpos-de-prova durante 90 s ao dentifrício resultou em redução de 89% da viabilidade do biofilme de *C. albicans*, confirmando os efeitos antimicrobianos deste agente de limpeza. Apesar da escovação com dentifrício ser efetiva na redução do biofilme, alguns efeitos adversos sobre as resinas acrílicas e dentes artificiais têm sido relatados na literatura<sup>24-25,39,56</sup>. O atrito entre as partículas inorgânicas do dentifrício e a superfície da prótese durante a escovação pode resultar em desgaste da resina acrílica e dentes artificiais e

aumento da rugosidade superficial<sup>23-24,39,56</sup>. A rugosidade superficial está diretamente relacionada com a adesão de microrganismos<sup>57,68</sup>. Segundo Verran Maryan<sup>68</sup>, um aumento na rugosidade superficial de resinas acrílicas facilita a retenção do microrganismo *C. albicans*. Radford et al.<sup>57</sup> verificaram, ainda, que, quanto maior a rugosidade superficial, maior é adesão de microrganismos a superfície das resinas acrílicas. Assim, um aumento na rugosidade causado pelo dentífrico pode favorecer a formação e estruturação de biofilmes na superfície interna das próteses, que, por sua vez, podem se disseminar e colonizar outras regiões da cavidade bucal.

O digluconato de clorexidina tem sido amplamente utilizado como agente desinfetante devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana<sup>18,20,53,62,64</sup>. Os resultados desta investigação demonstraram que escovação e exposição dos corpos-de-prova ao digluconato de clorexidina a 2% resultaram em 100% de redução da viabilidade do biofilme de *C. albicans*. Apesar da ação mecânica da escovação, estes resultados podem ser atribuídos, principalmente, ao efeito químico da solução sobre as células fúngicas<sup>34</sup>. MacNeill et al.<sup>34</sup> observaram que, após contato com digluconato de clorexidina, as células de *C. albicans* apresentaram severas degenerações do citoplasma (fragmentação e aglutinação dos componentes, vacuolização, acúmulo de lipídios e condensação) e fragmentação e descamação da parede celular, resultando em morte celular. A literatura apresenta diversos estudos relacionados à utilização do digluconato de clorexidina<sup>8-9,20,64,66-67</sup>. Resultados de estudos in vitro demonstraram a efetividade dessa solução sobre diferentes microrganismos<sup>64,66</sup>, enquanto que, em estudos in vivo, a escovação com este agente apresentou resultados positivos na redução do biofilme e gengivite<sup>8-9,20,67</sup>.

Além disso, outros autores observaram que a imersão de próteses totais em digluconato de clorexidina demonstrou excelentes resultados no controle do biofilme<sup>53</sup> e no tratamento da estomatite protética<sup>6</sup>.

O efetivo protocolo adotado neste estudo foi determinado com base em modificações de protocolos de investigações anteriores. Pavarina et al.<sup>53</sup> estabeleceram um protocolo de desinfecção de próteses, no qual 10 min de imersão em digluconato de clorexidina a 4% foi efetivo na inativação do biofilme presente sobre as superfícies das próteses. Porém, a concentração de digluconato de clorexidina a 4% pode causar efeitos deletérios sobre resinas acrílicas, como: manchamento, alteração da dureza e aumento da rugosidade superficial<sup>40,44,55</sup>. Considerando que os efeitos adversos desse agente de limpeza são determinados pelo tempo de exposição e concentração da solução, estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano do digluconato de clorexidina em concentrações e tempos de exposição reduzidos. Exposição a esse agente de limpeza a 2% por períodos de exposição inferiores (3 e 10 min) demonstrou-se efetiva na inativação de biofilmes maduros de diferentes microrganismos<sup>40,64</sup> e de células planctônicas de MRSA<sup>18</sup>. No presente estudo, um tempo de exposição/escovação ainda mais reduzido (90 s) demonstrou-se eficaz para a completa inativação do biofilme de *C. albicans*. Apesar do comprovado efeito antimicrobiano do digluconato de clorexidina, seu uso tem se tornado limitado devido a alguns efeitos colaterais que podem prejudicar a cooperação dos pacientes. Sabor desagradável<sup>8</sup> e descoloração da língua<sup>67</sup> e dentes naturais<sup>8-9</sup> têm sido relatados após o uso prolongado (1 a 6 meses) desta solução. Outros efeitos adversos, como aparecimento de feridas na boca, língua e/ou garganta, chiado no peito e falta de ar também foram verificados<sup>37</sup>. Além

disso, é importante ressaltar que o uso descontrolado deste agente antimicrobiano tem resultado no aparecimento de cepas resistentes ao digluconato de clorexidina, como o MRSA<sup>63</sup>.

Além dos resultados positivos obtidos com a utilização da solução de digluconato de clorexidina 2%, os resultados obtidos na presente investigação demonstraram que, quando a solução de hipoclorito de sódio a 1% foi utilizada como um agente adjunto à escovação, uma completa inativação da viabilidade do biofilme de *C. albicans* foi obtida. Foi verificado, ainda, que a exposição dos corpos-de-prova a este agente de limpeza durante 90 s resultou em menor redução (88%) da viabilidade do biofilme. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que verificaram que uma reduzida quantidade de células viáveis de *C. albicans* permaneceu sobre a superfície de material para base de prótese após longos períodos de imersão (10 min) em hipoclorito de sódio a 1%<sup>13,64</sup>. A relevância clínica desta evidência está relacionada ao fato de que as células sobreviventes têm a capacidade de se multiplicar e reativar o biofilme, perpetuando a fonte de contaminação e, conseqüentemente, resultando em infecções recorrentes. Assim, o efeito da ação mecânica exercida pela escovação<sup>35</sup>, comprovado no presente estudo, é essencial para se obter a completa inativação do biofilme. O mecanismo de ação antimicrobiano do hipoclorito de sódio tem sido relacionado às suas características físico-químicas e reação com os tecidos orgânicos, como os microrganismos. O hipoclorito de sódio é uma base forte (pH>11) e seu pH elevado altera a integridade da membrana citoplasmática através da degradação de fosfolipídios ou ácidos graxos insaturados ou por meio de injúrias aos componentes orgânicos e transporte de nutrientes. Esta reação causa uma inibição enzimática irreversível

e alterações no metabolismo celular, resultando em morte celular<sup>21</sup>. Apesar da efetividade da escovação com hipoclorito de sódio a 1% em inativar biofilme, este método de higienização pode apresentar algumas desvantagens. O odor e sabor desagradáveis são relatados pelos pacientes<sup>10</sup>. Outros inconvenientes relacionados aos efeitos corrosivos às estruturas metálicas<sup>4</sup> e deletérios às resinas acrílicas também têm sido apontados. Um aumento da rugosidade superficial e diminuição da dureza foram observados após imersão de materiais acrílicos em hipoclorito de sódio a 2% durante 5 min<sup>44,55</sup>. Entretanto, não foram verificadas mudanças significantes na dureza e rugosidade<sup>3</sup> de resinas acrílicas quando uma concentração de 1% de hipoclorito de sódio foi utilizada durante 10 min. Além disso, McNeme et al.<sup>38</sup> não observaram alterações de cor em resina acrílica após 72 h de imersão em hipoclorito de sódio a 1%. Assim, pode-se supor que o protocolo de escovação com hipoclorito de sódio a 1%, durante um reduzido período de tempo (90 s) adotado neste estudo, deve promover consistente erradicação do biofilme sem, contudo, resultar em efeitos indesejáveis nas propriedades dos materiais para bases de prótese, porém, esse protocolo de higienização deve ser avaliado a longo prazo.

O presente estudo constatou, também, que a escovação com Polident fresh cleanse<sup>®</sup> reduziu em 98% a viabilidade do biofilme de *C. albicans*. Uma menor redução (90%) na viabilidade do biofilme foi observada após exposição dos corpos-de-prova durante 90 s ao mesmo agente de limpeza. Esses resultados são consistentes com aqueles observados nos demais agentes de limpeza, em que a associação entre os métodos químico e mecânico apresentou maior redução da viabilidade do biofilme de *C. albicans* quando comparada à exposição dos corpos-de-prova aos produtos. O efeito

antimicrobiano deste novo agente de limpeza parece estar relacionado à presença do lauril sulfato de sódio e EDTA na sua composição. De acordo com alguns estudos, esses produtos apresentaram efeito antimicrobiano contra diferentes microrganismos<sup>22,27-28,54,59,61,71</sup>. O mecanismo de ação do lauril sulfato de sódio está relacionado à sua adsorção e penetração através dos poros da parede celular, seguida por uma interação com os principais componentes da membrana celular, lipídios e proteínas<sup>54</sup>. Isso leva a um aumento da permeabilidade celular, resultado em perda dos componentes intracelulares e lise celular<sup>54</sup>. Além disso, este detergente tem a capacidade de penetrar na superfície do biofilme, causando completa remoção da biomassa<sup>61</sup>. De maneira similar, o mecanismo de ação do EDTA sobre os microrganismos parece estar relacionado a danos estruturais na membrana celular<sup>46</sup>. Esses danos aumentam a permeabilidade da membrana celular e facilitam a penetração e ação de outros agentes antimicrobianos<sup>46</sup>. De fato, um estudo *in vitro* confirmou que o EDTA reduziu 99% do biofilme de *P. aeruginosa* e, quando combinado ao antibiótico gentamicina, houve uma completa inativação das células<sup>5</sup>. O EDTA também tem se mostrado eficaz na inativação de formas filamentosas e da formação do biofilme de *C. albicans*<sup>59</sup>. Considerando essas informações e os resultados do presente estudo, pode-se sugerir que o lauril sulfato de sódio e o EDTA foram responsáveis pela atividade antimicrobiana do Polident fresh cleanse<sup>®</sup>. Apesar de todos os agentes de limpeza testados terem se mostrado eficazes na redução da viabilidade do biofilme de *C. albicans*, o Polident fresh cleanse<sup>®</sup> apresenta algumas vantagens. Este agente de limpeza apresenta sabor agradável, fácil manuseio e não contém agentes abrasivos<sup>32</sup>, o que previne danos aos materiais acrílicos, como desgastes na resina acrílica e dentes artificiais e aumento da

rugosidade superficial<sup>23-25,39,56</sup>. Entretanto, este produto ainda não está disponível no mercado nacional, dificultando seu acesso pelos pacientes. Embora resultados positivos terem sido obtidos com a utilização do Polident fresh cleanse<sup>®</sup>, novos estudos precisam ser realizados para avaliar o espectro de atividade antimicrobiana deste agente e seus possíveis efeitos sobre as propriedades dos materiais para base de prótese.

**Conclusão**

## 7 CONCLUSÃO

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

1. Todos os grupos submetidos ao método de escovação com os diferentes agentes de limpeza apresentaram redução significativa da viabilidade do biofilme de *C. albicans*;
2. Escovação com digluconato de clorexidina a 2% e hipoclorito de sódio a 1% reduziu 100% a viabilidade do biofilme de *C. albicans*;
3. A ação mecânica exercida pelo método de escovação é um fator fundamental para a redução do biofilme.

## Referências

## 8 REFERÊNCIAS\*

1. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. incidence in denture wearers. *Mycopathologia*. 2010; 169: 365-72.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78: 455-9.
3. Azevedo A, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Magnani R. Effect of disinfectants on the hardness and roughness of relined acrylic resins. *J Prosthodont*. 2006; 15: 235-42.
4. Backenstose WM, Wells JG. Side effects of immersion-type cleansers on the metal components of dentures. *J Prosthet Dent*. 1977; 37: 615-21.
5. Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 2064-9.
6. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001; 21: 4-8.
7. Barnabé W, Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pregoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J. Oral Rehabil*. 2004; 31: 453-9.

---

\*De acordo com estilo Vancouver.

Disponível no site: [HTTP://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

8. Bassiouny MA, Grant AA. The toothbrush application of chlorhexidine. A clinical trial. *Br Dent J.* 1975; 139: 323-7.
9. Bay LM. Effect of toothbrushing with different concentrations of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis. *J Dent Res.* 1978; 57: 181-5.
10. Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *J Prosthet Dent.* 1998; 79: 454-8.
11. Budtz-Jørgensen E, Milton Knudsen A. Chlorhexidine gel and Steradent employed in cleaning dentures. *Acta Odontol Scand.* 1978; 36: 83-7.
12. Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Banon-Clement JM, Baehni P. Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Dis.* 1996; 2: 285-90.
13. Buegers R, Rosentritt M, Schneider-Brachert W, Behr M, Handel G, Hahnel S. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2008; 66: 174-80.
14. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 327-5.
15. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183: 5385-94.

16. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich 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: 903-8.
17. Davi LR, Peracini A, Ribeiro Nde Q, Soares RB, da Silva CH, Paranhos Hde F et al. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. *Gerodontology.* 2010; 27: 297-02.
18. DeBaun B. Evaluation of the antimicrobial properties of an alcohol-free 2% chlorhexidine gluconate solution. *AORN J.* 2008; 87: 925-33.
19. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, de Oliveira JA, Vergani CE, Machado AL. Microwave disinfection of complete dentures contaminated in vitro with selected bacteria. *J Prosthodont.* 2009; 18: 611-7.
20. Epstein J, Ransier A, Lunn R, Spinelli J. Enhancing the effect of oral hygiene with the use of a foam brush with chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 77: 242-7.
21. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002; 13: 113-7.
22. Fidalgo TK, Barcelos R, Portela MB, Soares RM, Gleiser R, Silva-Filho FC. Inhibitory activity of root canal irrigants against *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Braz Oral Res.* 2010; 24: 406-12.

23. Freitas KM, Paranhos H F. Weight loss of five commercially available denture teeth after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14: 242-6.
24. Harrison Z, Johnson A, Douglas WI. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. *J Oral Rehab.* 2004; 31: 460-7.
25. Haselden CA, Hobkirk JA, Pearson GJ, Davies EH. A comparison between the wear resistance of three types of denture resin to three different dentifrices. *J Oral Rehabil.* 1998; 25: 335-9.
26. International Organization for Standardization. Specification 1567 for denture base polymers. 2nd ed. Switzerland: ISO; 1999.
27. Jenkins S, Addy M, Newcombe R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthwashes (I). Effects on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 140-4.
28. Jenkins S, Addy M, Newcome R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthrinses. (II). Effects of 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 145-8.
29. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53: 383-5.
30. Law V, Seow WK. A longitudinal study of 0.2% chlorhexidine gel for removal of mutans streptococci infection in preschool children. *Aust Dent J.* 2007; 52: 26-32.

31. Lima EM, Moura JS, Del Bel Cury AA, Garcia RC, Cury JA. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2006; 33: 356-62.
32. Liquid denture cleanser composition and method of application [citado 2009, outubro, 06]. Disponível no site: <http://www.freepatentsonline.com/4701223>
33. Ma T, Johnson GH, Gordon GE. Effects of chemical disinfectants on the surface characteristics and color of denture resins. *J Prosthet Dent.* 1997; 77: 197-04.
34. MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 753-60.
35. MacNeill S, Walters DM, Dey A, Glaros AG, Cobb CM. Sonic and mechanical toothbrushes. An in vitro study showing altered microbial surface structures but lack of effect on viability. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 988-93.
36. Marchini L, Tamashiro E, Nascimento DF, Cunha VP. Self-reported denture hygiene of a sample of edentulous attendees at a University dental clinic and the relationship to the condition of the oral tissues. *Gerodontology.* 2004; 21: 226-8.
37. McCoy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miller DR, Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139: 178-83.

38. McNeme SJ, von Gonten AS, Woolsey GD. Effects of laboratory disinfecting agents on color stability of denture acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1991; 66: 132-6.
39. Mendonça MJ, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Weight loss and surface roughness of hard chairside relined resins after toothbrushing: influence of postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont.* 2006; 19: 281-7.
40. Montagner H, Montagner F, Braun KO, Peres PE, Gomes BP. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17: 432-5.
41. Moore C, Addy M, Moran J. Toothpaste detergents: a potential source of oral soft tissue damage? *Int J Dent Hyg.* 2008; 6: 193-8.
42. Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. *J Prosthet Dent.* 1984; 52: 158-63.
43. Moran J, Addy M, Wade W. Determination of minimum inhibitory concentrations of commercial toothpastes using an agar dilution method. *J Dent.* 1988; 16: 27-31.
44. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. *J Prosthet Dent.* 2005; 93: 171-6.
45. Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. *Br Dent J.* 1962; 112: 357-60.
46. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67: 593-656.

47. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent.* 1998; 26: 299-304.
48. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999; 12: 153-9.
49. Orsi IA, Junior AG, Villabona CA, Fernandes FH, Ito IY. Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerised acrylic resin. *Gerodontology.* 2010; 1-5.
50. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E et al. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont.* 2009; 18: 427-31.
51. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2007; 34: 606-12.
52. Paraskevas S, Rosema NA, Versteeg P, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. The additional effect of a dentifrice on the instant efficacy of toothbrushing: a crossover study. *J Periodontol.* 2007; 78: 1011-6.
53. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003; 30: 532-6.

54. Petersen FC, Assev S, Scheie AA. Combined effects of NaF and SLS on acid- and polysaccharide-formation of biofilm and planktonic cells. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 665-71.
55. Pinto LR, Acosta EJ, Távora FF, da Silva PM, Porto VC. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard reline acrylic resins. *Gerodontology.* 2010; 27: 147-53.
56. Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont.* 2010; 19: 369-73.
57. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent.* 1998; 26: 577-83.
58. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 53-9.
59. Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). *Mycopathologia.* 2007; 164: 301-6.
60. Ribeiro DG, Pavarina DG, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Flexural strength and hardness of reline and denture base acrylic resins after different exposure times of microwave disinfection. *Quintessence Int.* 2008; 39: 833-40.

61. Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC et al. Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 1006-14.
62. Semenoff TADV, Semenoff-Segundo A, Borges AH, Pedro FML, Caporossi LS, Rosa-Júnior A. Antimicrobial activity of 2% chlorhexidine gluconate, 1% sodium hypochlorite and paramonochlorophenol combined with furacin against *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis* and *P. aureginosa*. *Rev. Odonto Ciênc.* 2010; 25: 174-7.
63. Sheng WH, Wang JT, Lauderdale TL, Weng CM, Chen D, Chang SC. Epidemiology and susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: emphasis on chlorhexidine susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 63: 309-13.
64. Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008; 17: 627-33.
65. Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 94: 149-56.
66. Sousa FA, Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. *Braz Oral Res.* 2009; 23: 381-5.

67. Van Strydonck DA, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden F. Clinical efficacy of a chlorhexidine-delivering toothbrush. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 584-90.
68. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997; 77: 535-9.
69. Wade W, Addy M, Hughes J, Milsom S, Doherty F. Studies on stannous fluoride toothpaste and gel (1). Antimicrobial properties and staining potential in vitro. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 81-5.
70. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology.* 2005; 22: 168-76.
71. Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. *J Endod.* 1995; 21: 592-3.
72. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol.* 2010; 55: 763-70.
73. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: A comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13: 136-40.

**Apêndice**

## Apêndice

Tabela 1A - Dados dos valores originais de absorvância das triplicatas das três ocasiões referentes à viabilidade do biofilme de *C. albicans* após escovação e imersão em água

Repetição	Método	
	Escovação	Imersão
1	0,011	1,576
2	0,082	1,505
3	0,084	1,307
4	0,078	1,663
5	0,086	2,130
6	0,015	2,041
7	0,043	1,457
8	0,045	0,964
9	0,051	1,220

Tabela 2A - Dados dos valores originais de absorbância das triplicatas das três ocasiões referentes à viabilidade do biofilme de *C. albicans* após escovação e imersão em solução de água/dentífrício

Repetição	Método	
	Escovação	Imersão
1	0,047	0,145
2	0,006	0,192
3	0,032	0,126
4	0,033	0,115
5	0,037	0,167
6	0,005	0,218
7	0,023	0,151
8	0,019	0,197
9	0,027	0,215

Tabela 3A - Dados dos valores originais de absorbância das triplicatas das três ocasiões referentes à viabilidade do biofilme de *C. albicans* após escovação e imersão em solução de digluconato de clorexidina a 2%

Repetição	Método	
	Escovação	Imersão
1	0,000	0,000
2	0,000	0,000
3	0,000	0,000
4	0,000	0,000
5	0,000	0,000
6	0,000	0,000
7	0,000	0,000
8	0,000	0,000
9	0,000	0,000

Tabela 4A - Dados dos valores originais de absorbância das triplicatas das três ocasiões referentes à viabilidade do biofilme de *C. albicans* após escovação e imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1%

Repetição	Método	
	Escovação	Imersão
1	0,000	0,187
2	0,000	0,203
3	0,000	0,205
4	0,000	0,197
5	0,000	0,205
6	0,000	0,167
7	0,000	0,157
8	0,000	0,197
9	0,000	0,163

Tabela 5A - Dados dos valores originais de absorbância das triplicatas das três ocasiões referentes à viabilidade do biofilme de *C. albicans* após escovação e imersão em solução de Polident fresh cleanse®

Repetição	Método	
	Escovação	Imersão
1	0,028	0,150
2	0,016	0,207
3	0,000	0,135
4	0,044	0,128
5	0,074	0,161
6	0,043	0,130
7	0,047	0,147
8	0,011	0,158
9	0,044	0,194

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservados ao autor).

Araraquara, 25 de março de 2011.

**Delise Pellizzaro**