UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANDRÉA LEMOS FALCÃO PROCÓPIO

**Efeito antimicrobiano residual e citotoxicidade in vitro de resina
acrílica para base de prótese após imersão prolongada em agentes
de limpeza**

BAURU
2015

ANDRÉA LEMOS FALCÃO PROCÓPIO

**Efeito antimicrobiano residual e citotoxicidade in vitro de resina
acrílica para base de prótese após imersão prolongada em agentes
de limpeza**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karin Hermana Neppelenbroek

BAURU
2015

P942e Procópio, Andréa Lemos Falcão
Efeito antimicrobiano residual e citotoxicidade in vitro de resina acrílica para base de prótese após imersão prolongada em agentes de limpeza/ Andréa Lemos Falcão Procópio. – Bauru, 2015.

130 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof.^a Dr.^a Karin Hermana Neppelenbroek

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº CAAE: 39465514.9.0000.5417

Data: 09/12/2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar pessoas tão especiais no meu caminho e por tudo que tem me proporcionado.

Aos meus pais, **Silvia** e **Rubens**, por sempre acreditam em mim e nos meus sonhos e não medirem esforços para que eu consiga realizá-los. Pelo incentivo e amor incondicional, por serem meu ponto de apoio e meus maiores exemplos, afinal, sem eles nada disso seria possível.

À minha irmã, **Luisa**, que mesmo distante se faz sempre presente, por cuidar dos meus pais durante esses dois anos em que estive longe e por manter sempre a alegria em casa.

Ao **Leo**, pelo apoio, paciência, imensa compreensão e pelo companheirismo de sempre. Obrigada por acreditar, mais do que eu, na minha capacidade e por me incentivar tanto.

As meninas do meu grupo de pesquisa, **Juliana Hotta**, **Jozely Mello**, e **Janaína Maciel** pela parceria de sempre, por me ajudarem e me substituírem tão bem quando não pude estar presente. Também agradeço ao **Vinicius Sakima**, por ajudar no desenvolvimento prático dessa pesquisa.

Aos professores do Departamento de Prótese, **Prof. Dr. Accácio Lins do Valle**, **Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida**, **Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo**, **Prof. Dr. Estevam Augusto Bonfante**, **Prof. Dr. Gerson Bonfante**, **Prof. Dr. José Henrique Rubo**, **Prof.^a Dr.^a Lucimar Falavinha Vieira**, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, **Prof. Dr. Pedro César García de Oliveira**, **Prof. Dr. Renato de Freitas**, **Prof.^a Dr.^a Simone Soares**, **Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto** e **Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela**, pela boa convivência e conhecimentos científicos compartilhados.

Agradeço em especial ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro** pela competência, seriedade, amor ao ensino e, por ser exemplo de sabedoria de vida e conhecimentos científicos. Professor, obrigada por ser fonte de inspiração para mim e para tantos outros.

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), em especial à **Rafaela Alves da Silva Alavarce (Rafa)**, responsável pela minha iniciação no mundo novo da microbiologia e de fundamental ajuda no desenvolvimento da pesquisa. Obrigada pela paciência e por me atender em todos os momentos que precisei.

À Prof.^a Dr.^a **Carla Andreotti Damante** e a aluna de doutorado **Paula Stephania Brandão Hage Karam**, do departamento de Periodontia da FOB-USP, por ceder às células utilizadas nesta pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a **Vanessa Migliorini Urban** por realizar a análise estatística da minha pesquisa.

A todos os funcionários do Departamento de Prótese, em especial à **Deborah e Cláudia**.

Às funcionárias da clínica de Pós-Graduação, **Cleuza e Hebe**, por tornar a rotina da clínica mais leve e descontraída. Obrigada pela ajuda de sempre.

A todos os colegas de curso de mestrado (**Fernanda, Guilherme, Gustavo, Ilana, Oscar, Patrick, Thereza, Verena e Vinicius**) pelo companheirismo, por todas as experiências trocadas, pelas dicas e ajuda diária nas clínicas e na vida. Cada um foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional dentro do mestrado.

Às minhas amigas do coração **Verena (Bode) e Fernanda**, por serem tão especiais e importantes pra mim durante esse período. Obrigada por toda ajuda, conselhos, companheirismo e as muitas risadas. **Bodinha**, obrigada por ser exemplo de força e determinação, por compartilhar comigo as dores e alegrias dessa caminhada, seu apoio foi fundamental.

À minha amiga-irmã-gêmea **Ilana (Biu)** que cumpre o papel de amiga, mãe, 'Chef de cozinha' e que deu o privilégio dividir sua vida e do **Nino** comigo, tornando meus dias mais felizes e completos em Bauru. Biu, muito obrigada por estar presente em todos os momentos (bons e de dificuldade) desta nova fase. Obrigada pela amizade incondicional, sincera e verdadeira, por todo apoio e carinho. Espero que eu consiga retribuir da mesma forma tudo que você tem feito por mim.

À minha amiga-irmã **Thereza** que desde o início esteve presente em todos os momentos, o que foi de ajuda fundamental para minha adaptação a vida nova em Bauru. The, obrigada por todas as conversas, conselhos, risadas, por me salvar de várias formas diferentes e por tudo que passamos juntas.

A todos os alunos de doutorado da Reabilitação Oral, em especial **Luana Menezes de Mendonça, Max Dória Costa, Luis Alvez de Oliveira Neto, Vinicius Pavesi Fardin e Victor Guarçoni de Paula**, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade construída.

À minha amiga **Laís**, muito obrigada pela companhia, amizade, conselhos e apoio em qualquer decisão. Por estar sempre disposta a ajudar e por ser tão alto astral contagiando todos a sua volta com sua alegria e disposição para comemorar a vida. Obrigada por sempre me receber tão bem na sua casa, você faz isso como ninguém!

Aos meus amigos queridos **Camila Libardi e Ricardo Arantes** por todos os momentos divertidos vividos e pela ajuda de sempre. Sei que posso contar com vocês.

As minhas amigas de Maceió, **Cléo, Giulianna, Jéssica, Kycia, Layla, e Mariah**, que hoje estão espalhadas pelo mundo, mas sempre unidas pelo coração. Muito obrigada pela torcida e pelo carinho de sempre.

À Faculdade de Odontologia de Bauru FOB-USP, por abrir as portas para o início da minha carreira acadêmica e me propiciar enriquecimento profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP pelo apoio financeiro por meio do auxílio à pesquisa sob processo 2012/11074-2.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq pela bolsa de Mestrado, auxílio indispensável para realização deste trabalho.

Ao apoio financeiro concedido pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP -PROAP.

Finalmente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desta pesquisa e a todos que estiveram ao meu lado no decorrer do curso de Mestrado.

Obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Não teria como deixar de agradecer à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Karin Hermana Neppelenbroek, por todos os ensinamentos transmitidos, pela amizade, pelo companheirismo, pela cumplicidade, por servir de exemplo e inspiração para mim e, principalmente, por exercer o papel de orientar no sentido mais completo da palavra.

Acredito que nada é por acaso e que Deus sabia exatamente o que estava fazendo quando te colocou em meu caminho. Hoje, não faria diferente e se pudesse te escolheria outras mil vezes para ser minha orientadora. Espero um dia ser parecida com você. Minha profunda gratidão e obrigada de coração por tudo!

RESUMO

O presente estudo in vitro objetivou avaliar a longo prazo o potencial antimicrobiano residual e a citotoxicidade de soluções químicas de limpeza de prótese quando incorporadas à resina acrílica termopolimerizável após sucessivos ciclos de imersão noturna diária. Discos (10mm x 1mm) de resina acrílica termopolimerizável para base de prótese (Lucitone 550) foram submetidos a três ciclos diários de desinfecção (8h/cada) em hipoclorito de sódio a 1% (NaClO), digluconato de clorexidina a 2% (CLX) ou água destilada (controle) durante 91 (T91) ou 183 dias (T183), simulando o período de 9 meses ou 1,5 ano de imersão noturna diária realizada pelo paciente. Inicialmente, foi utilizado o método de concentração inibitória mínima em caldo para determinar o possível efeito residual (incorporação) das soluções à resina acrílica. Metade dos discos imersos em cada agente de limpeza em um dos tempos de imersão (n=5) foi inoculada (1×10^7 cels/mL) com um dos patógenos associados à estomatite protética: *Candida albicans* (Ca) e *Staphylococcus aureus* (Sa). Os discos foram incubados a 37°C para análise em espectrofotômetro após 24h, 7 e 14 dias. Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagens de inibição microbiana. Confirmada a ação antimicrobiana residual dos agentes de limpeza incorporados à resina acrílica, foi então analisada sua citotoxicidade in vitro sobre fibroblastos gengivais humanos (L929). Os efeitos citotóxicos foram avaliados por meio do ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio] para a determinação da viabilidade celular, após as células serem expostas por 24h às amostras de cada condição experimentais (n=18) previamente imersas em uma das soluções por um dos períodos avaliados (T91 ou T183). A citotoxicidade foi determinada com base na atividade mitocondrial em relação a corpos de prova não submetidos à imersão nas soluções testadas. Os resultados do ensaio do MTT foram analisados estatisticamente por ANOVA-1 fator seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey HSD ($\alpha=0,05$). Para os períodos T91 e T183, não houve inibição microbiana com a imersão em água (controle) em até 14 dias de incubação. A CLX inibiu progressivamente o crescimento microbiano ao longo dos 14 dias para ambos os períodos de imersão (Ca: 19 a 73,58%; Sa: 0 a 87,08%), sendo observada maior ação antimicrobiana em T183. O NaClO apresentou discreta inibição microbiana

apenas no período de 14 dias tanto em T91 (Ca: 0%; Sa: 2,70%) quanto em T183 (Ca: 8,50%; Sa: 15,08%). De acordo com os resultados do teste de MTT, as soluções químicas de limpeza testadas apresentaram uma redução significativa da viabilidade celular quando comparado às células controles propagadas apenas em meio de cultura ($p < 0,002$). A CLX resultou na menor viabilidade celular em ambos os períodos de imersão ($p < 0,018$). As amostras de resina acrílica imersas em água ou NaClO em T91 e T183 apresentaram viabilidade celular estatisticamente similar às amostras não imersas ($p > 0,05$). Pode-se concluir que a CLX incorporada à resina acrílica para base de prótese apresentou um efeito antimicrobiano residual em ambos os períodos de imersão noturna, o que não foi observado com o NaClO. Por outro lado, a CLX residual resultou em efeito intensamente citotóxico aos fibroblastos gengivais humanos quando comparada ao NaClO e à água destilada, que se apresentaram discretamente citotóxicos. Esses resultados sugerem precaução na seleção de agentes de limpeza para prótese como meio de prevenção e tratamento adjunto da estomatite protética, pois mesmo em concentrações baixas, recomendadas para imersão noturna, podem apresentar algum grau de toxicidade às mucosas de suporte protético.

Palavras-chave*: Higienizadores de Dentadura. Hipoclorito de sódio. Clorexidina. Teste de Biocompatibilidade. Toxicidade. Prótese Total. Estomatite sob Prótese.

* Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponíveis no domínio: <http://decs.bvs.br/>

ABSTRACT

***In vitro* residual antimicrobial effect and cytotoxicity of acrylic resin base prosthesis after long-term immersion in cleaning agents**

This *in vitro* study aimed to evaluate the long-term residual antimicrobial activity and cytotoxicity of chemical denture cleansers incorporated into a heat-polymerized acrylic resin after successive cycles of daily overnight soaking. Discs (10mm x 1mm) were prepared from heat-polymerized acrylic resin (Lucitone 550) and submitted to three daily immersion (8h/each) in 1% sodium hypochlorite (NaClO), chlorhexidine digluconate 2% (CHX) or distilled water (control) for 91 days (T91) or 183 days (T183), simulating the period of 9 months or 1.5 year of nocturnal immersion performed by the patient. Initially, the method of minimum inhibitory concentration in broth was used to determine the possible residual effect (incorporation) of the acrylic resin solution. Half of the disks immersed in each cleaning agent for one of the period immersion (n=5) was inoculated (1×10^7 cells/mL) with pathogens associated with denture stomatitis: *Candida albicans* (Ca) or *Staphylococcus aureus* (Sa). The disks were incubated at 37°C for analysis in a spectrophotometer after 24h, 7 and 14 days. The absorbance values were expressed as percentages of microbial inhibition. Confirmed the residual antimicrobial action of cleaning agents incorporated into the acrylic resin, its cytotoxicity was analyzed *in vitro* on human gingival fibroblasts (L929). Cytotoxic effects were evaluated by the colorimetric assay MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide] to determine cellular viability after the cells were exposed for 24h to the samples of each experimental condition (n=18) previously immersed in one of the solutions for the evaluation periods (T91 or T183). Cytotoxicity was determined based on mitochondrial activity compared to the specimens not subjected to immersion in the solutions. The MTT assay results were 1-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test ($\alpha=0.05$). For the periods T91 and T183, no microbial inhibition was observed with immersion in water (control) for up to 14 days of incubation. The CHX progressively inhibited microbial growth over the 14 days for both immersion times (Ca: 19 to 73.58%, Sa: 0 to 87.08%); with greater antimicrobial activity in T183. The NaClO showed a slight microbial inhibition only in the 14-day period in both T91 (Ca: 0%; Sa: 2.70%) and T183 (Ca: 8.50%; Sa: 15.08%). According to the results of the MTT assay, the chemical cleaning solutions

tested showed a significant reduction in cell viability when compared to the control cells propagated in normal culture medium ($p < 0.002$). The CHX resulted in the lowest cell viability in both immersion periods ($p < 0.018$). The acrylic samples immersed in water or NaClO in T91 and T183 showed cell viability statistically similar to non-immersed samples ($p > 0.05$). CHX incorporated into the acrylic resin denture base had a residual antimicrobial effect on both immersion periods, which was not observed with NaClO. On the other hand, the residual CHX were severely cytotoxic to human gingival fibroblasts compared to NaClO and distilled water which were slightly cytotoxic. These results suggest caution in selecting denture cleaning agents as a method of prevention and adjunct treatment of denture stomatitis because even at low concentrations recommended for overnight immersion, they may exhibit some degree of toxicity to the denture bearing mucosa.

Keywords*: Denture Cleansers. Sodium Hypochlorite. Chlorhexidine. Biocompatibility Testing. Toxicity. Denture, Complete. Stomatitis, Denture.

*In accordance with Health Sciences Descriptors (DeCS) available at <http://decs.bvs.br/>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Estomatite protética: Etiologia, patogênese e terapêutica	21
2.2	Inibição microbiana x agentes de limpeza para próteses removíveis	35
2.3	Imersão prolongada em agentes de limpeza x propriedades de materiais para base de prótese e dentes artificiais.....	51
2.4	Citotoxicidade de agentes de limpeza e materiais para base de próteses removíveis.....	56
3	PROPOSIÇÃO	73
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.1	Confecção dos corpos de prova	77
4.2	Ciclos diários de imersão.....	81
4.3	Análise do efeito residual dos agentes desinfetantes	82
4.4	Análise da citotoxicidade	85
4.5	Delineamento experimental	89
5	RESULTADOS	91
5.1	Inibição de crescimento microbiano.....	91
5.2	Viabilidade celular.....	94
6	DISCUSSÃO	99
7	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXOS	127

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética, considerada a forma mais comum de candidose oral, tem sido relatada em 11 a 67% dos portadores de próteses removíveis (BARBEAU et al., 2003; BARNABE et al., 2004; FIGUEIRAL et al., 2007; GENDREAU; LOEWY, 2011; RAMAGE et al., 2004; SALERNO et al., 2011; WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005). Essa recorrente patologia pode se manifestar clinicamente por meio de diferentes níveis de inflamação e eritema nos tecidos de suporte da prótese, variando de múltiplos pontos hiperêmicos a áreas eritematosas difusas e hiperplasia papilar (NEWTON, 1962). A estomatite protética apresenta-se frequentemente assintomática, mas quando os sinais e sintomas estão presentes, podem manifestar-se em forma de sangramento da mucosa bucal, inchaço, prurido, desconforto, ardor, halitose, gosto desagradável e xerostomia, além de lesões associadas, como queilite angular e glossite romboide mediana (ARENDORF; WALKER, 1987; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; JEGANATHAN; LIN, 1992; SALERNO et al., 2011).

Embora tenha sua etiologia reconhecida como multifatorial, a infecção por *Candida* tem sido apontada como o principal fator associado à estomatite protética (BANTING; HILL, 2001; BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; MARTORI et al., 2014; RAMAGE et al., 2004). Aproximadamente 93% dos indivíduos com sinais clínicos dessa patologia apresentam infecção fúngica (BAENA-MONROY et al., 2005; BANTING; HILL, 2001; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; PIRES et al., 2002), sendo a *Candida albicans* a espécie mais comumente identificada (BAENA-MONROY et al., 2005; BARBEAU et al., 2003; MIMA et al., 2012). Dessa forma, são relevantes os fatores etiológicos locais e sistêmicos relacionados com a capacidade de adesão e proliferação de *Candida* spp. nos tecidos bucais do paciente, que podem levar ao desenvolvimento da estomatite protética quando as condições do ambiente bucal se tornam favoráveis e também quando os fatores sistêmicos levam a uma diminuição dos mecanismos de defesa do organismo (BILHAN et al., 2009; SALERNO et al., 2011). Entre os fatores sistêmicos podem ser citados debilidade física, senilidade, alergia, tabaco, endocrinopatologias, deficiências nutricionais, imunossupressores, alterações nos mecanismos imunológicos e uso de antibióticos de amplo espectro (BUDTZ-JORGENSEN, 1974;

FIGUEIRAL et al., 2007). Fatores locais frequentemente associados ao desenvolvimento da estomatite protética incluem trauma local causado pela prótese, xerostomia, higiene inadequada, próteses antigas e mal adaptadas e uso contínuo das mesmas, sobretudo no período noturno (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; FIGUEIRAL et al., 2007; MARTORI et al., 2014; NEPPELENBROEK et al., 2008; WEBB et al., 2005; WEBB et al., 1998).

As próteses removíveis parciais e totais funcionam como agentes catalisadores na iniciação da estomatite protética, pois podem bloquear o fluxo de anticorpos da saliva e a ação mecânica de limpeza da língua, desenvolvendo um ambiente aeróbico e acidulado propício para a proliferação microbiana e a formação de biofilmes (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; MAHONEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998). As células de *Candida* spp. apresentam capacidade de adesão não apenas às células epiteliais da mucosa bucal, mas também à resina acrílica da base das próteses, colonizando-a em profundidade (BUDTZ-JORGENSEN, 1990; CHAU et al., 1995; DAVENPORT, 1970). Apesar da infecção pelas espécies de *Candida* ser considerada o principal fator etiológico da estomatite protética, a presença de outros micro-organismos também pode estar secundariamente envolvida com a patogenia dessa lesão (BAENA-MONROY et al., 2005; KULAK et al., 1997; LAMFON et al., 2005; PEREIRA et al., 2013; SATO et al., 1997). O biofilme protético é considerado complexo, sendo formado por leveduras, bactérias e células epiteliais descamativas (SATO et al., 1997). As formas mais comuns de bactérias isoladas de biofilmes presentes nas próteses são os bacilos e os cocos, especialmente as espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* (BAENA-MONROY et al., 2005; GLASS et al., 2001; SATO et al., 1997). Tem sido demonstrada uma frequente colonização da mucosa bucal e da superfície interna das próteses removíveis por *C. albicans* e *Staphylococcus aureus*, sendo essa associação microbiana também observada na maioria dos pacientes com estomatite protética (BAENA-MONROY et al., 2005; CHOPDE et al., 2012; PEREIRA et al., 2013).

Tendo em vista as considerações anteriores, é possível sugerir que, mesmo sem outros fatores predisponentes, a superfície tecidual das próteses removíveis, sobretudo as totais superiores, favorece o desenvolvimento da estomatite protética (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; MIMA et al., 2012). Por isso, a prevenção dessa patologia deve ser direcionada aos procedimentos de limpeza e

desinfecção das próteses de forma a minimizar a formação de biofilme na superfície acrílica das bases protéticas (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; MIMA et al., 2012; NEPPELENBROEK et al., 2008; WEBB et al., 1998).

Entre os métodos de higienização das próteses podem ser citadas a limpeza por escovação e a imersão em agentes químicos (FELTON et al., 2011; PAVARINA et al., 2003). A escovação associada a algum tipo de detergente, sabão ou dentífrico é o método utilizado pela maioria dos usuários de próteses removíveis (COELHO; SOUSA; DARE, 2004; PARASKEVAS et al., 2007). No entanto, a escovação isoladamente é considerado um método insuficiente para prevenir a formação do biofilme protético (DILLS et al., 1988) uma vez que as irregularidades e porosidades presentes na resina acrílica dificultam a ação da escova (CHAU et al., 1995; DAVENPORT, 1970; GORNITSKY et al., 2002; WEBB et al., 1998). Além disso, a limpeza efetiva das próteses pela escovação requer certo grau de destreza manual e acuidade visual dos usuários, o que é frequentemente comprometido em pacientes idosos e/ou portadores de deficiências (ASSUNÇÃO et al., 2001; GORNITSKY et al., 2002). Assim, para assegurar o controle do biofilme presente nas próteses, é necessário associar a escovação à imersão diária em agentes químicos de limpeza (CHAU et al., 1995; DILLS et al., 1988).

Os agentes de limpeza são bem aceitos por usuários de próteses removíveis, pois são simples de manusear, acessíveis, possuem uma boa relação custo-benefício, sendo também adequados para pacientes institucionalizados (DE ANDRADE et al., 2012; PAVARINA et al., 2003; WEBB et al., 2005). Dentre as soluções utilizadas para limpeza e desinfecção de próteses totais, destacam-se o hipoclorito de sódio e o digluconato de clorexidina, que além de serem efetivos no controle do biofilme protético (DE ANDRADE et al., 2012; PELLIZZARO et al., 2012; ROSSATO et al., 2011), também são recomendados como métodos adjuntos ao tratamento da estomatite protética (BANTING; HILL, 2001; BARNABE et al., 2004; WEBB et al., 2005).

O hipoclorito de sódio é um dos mais agentes químicos mais antigos e utilizados para limpeza e desinfecção de próteses totais. Esse fato pode ser atribuído à sua ação fungicida e bactericida e capacidade de dissolução de material orgânico, cálculo e mucina, o que resulta em remoção do biofilme protético bem como de manchas presentes na resina acrílica (ABELSON, 1985; BUDTZ-JORGENSEN, 1979; SKUPIEN et al., 2013). A clorexidina é um agente antisséptico

com um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo considerada estável na forma de digluconato. Esta solução tem uma ação dual sobre *Candida* spp., pois atua, mesmo em concentrações baixas, como agente fungicida e, simultaneamente, suprime de forma significativa a adesão desses micro-organismos a substratos orgânicos e inorgânicos (OLSEN, 1975), resultando na prevenção da formação do biofilme protético (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2000). Ainda, a atividade antimicrobiana da clorexidina mostra efeitos residuais, caracterizados por uma liberação gradual a longo prazo, denominada de substantividade (GREENSTEIN; BERMAN; JAFFIN, 1986). Apesar dessas propriedades benéficas, alguns efeitos adversos têm sido relacionados a tais agentes de limpeza. Soluções à base de clorexidina utilizadas por períodos prolongados podem resultar em manchamento das bases das próteses (ASAD; WATKINSON; HUGGETT, 1993) e do epitélio da língua (BUDTZ-JORGENSEN; LOE, 1972), além de redução da dureza de dentes artificiais acrílicos (CAMPANHA et al., 2012). Em relação ao hipoclorito de sódio, tem sido relatado que sua imersão durante longos períodos pode ser corrosiva para os metais e ter influência na estabilidade de cor, resistência à flexão, rugosidade e dureza da resina das bases das próteses (DAVI et al., 2010; FELIPUCCI et al., 2011; HONG et al., 2009; PARANHOS et al., 2013).

Outra preocupação está relacionada aos efeitos citotóxicos que os agentes de limpeza podem causar aos tecidos bucais. Sagripanti e Bonifacino (2000) observaram toxicidade moderada em diferentes concentrações do hipoclorito de sódio para diversas células do organismo humano, incluindo células dérmicas e do epitélio bucal (HIDALGO; BARTOLOME; DOMINGUEZ, 2002; SAGRIPANTI; BONIFACINO, 2000). A clorexidina, mesmo em concentrações muito abaixo das utilizadas na prática clínica, também tem demonstrado efeitos tóxicos significativos para uma variedade de tipos de células, tais como fibroblastos dérmicos (HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001), células do epitélio bucal (EREN; OZMERIC; SARDAS, 2002) e linfócitos (ARABACI et al., 2013). De fato, há evidências de que este composto pode ter efeitos adversos em concentrações clínicas, pois vários autores sugeriram que a clorexidina apresenta graus de genotoxicidade e citotoxicidade sobre os tecidos orais e das células, mesmo em formulações utilizadas clinicamente (ARABACI et al., 2013; GIANNELLI et al., 2008; HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001; LI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2004; SAGRIPANTI; BONIFACINO, 2000; SHETTY et al., 2014). Para minimizar os efeitos citotóxicos dos agentes de limpeza, tem sido recomendada

a diluição dessas soluções, obtendo-se menores concentrações (ARABACI et al., 2013).

Com o objetivo de se obter um método de limpeza diário de próteses removíveis com maior biocompatibilidade aos tecidos bucais, alguns estudos têm demonstrado a efetividade antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina em baixas concentrações (ALTIERI et al., 2013; DA SILVA, P. M. et al., 2011; MONTAGNER et al., 2009; PELLIZZARO et al., 2012; RODRIGUEZ ACOSTA et al., 2014; WEBB et al., 2005). Entretanto, tais pesquisas não avaliaram o efeito antimicrobiano das soluções de baixas concentrações a longo prazo, simulando a rotina caseira de imersão noturna das próteses pelos pacientes (8h/dia). Na literatura disponível, apenas existem estudos do uso prologado desses agentes de limpeza em regime de imersão noturna sobre as propriedades de dentes acrílicos artificiais (PISANI; MACEDO; et al., 2012), resinas acrílicas termopolimerizáveis (PARANHOS et al., 2013; PISANI et al., 2010) e materiais resilientes para base de próteses (PISANI; DA SILVA; et al., 2012).

Apesar de ter sido evidenciada a citotoxicidade das soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina, tais resultados devem ser avaliados com cautela ao se considerar o uso desses agentes de limpeza em próteses removíveis. Isso porque os estudos de citotoxicidade previamente descritos na literatura disponível utilizaram as próprias soluções diretamente em contato com células humanas ou de animais (ARABACI et al., 2013; GHABANCHI et al., 2013; GIANNELLI et al., 2008; HIDALGO et al., 2002; HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001; LI et al., 2014; MIRHADI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2004; SAGRIPANTI; BONIFACINO, 2000) ou ainda na forma de outras aplicações clínicas, como irrigantes de canais radiculares (ALKAHTANI et al., 2014; CHANDRASEKHAR et al., 2013; SHETTY et al., 2014) ou agentes incorporados a materiais restauradores (IZ et al., 2013). Assim, falta informação dos possíveis efeitos citotóxicos dos agentes de limpeza que ficam incorporados na resina acrílica das bases protéticas submetidas à imersão rotineira por longos períodos.

Clinicamente, as próteses removíveis são submetidas diariamente, geralmente no período noturno, à imersão em soluções de limpeza seguida de enxague em água corrente. Assim, o contato dos tecidos de suporte dos pacientes não ocorre diretamente com os agentes químicos, mas com o que permaneceu incorporado às bases protéticas, mesmo após o enxague das próteses desinfetadas.

Portanto, torna-se necessário avaliar o potencial antimicrobiano residual e a citotoxicidade em longo prazo das soluções de digluconato de clorexidina e hipoclorito de sódio que ficam incorporadas à resina acrílica para base de prótese submetida a ciclos diários de imersão nesses agentes de limpeza.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA: ETIOLOGIA, PATOGÊNESE E TERAPÊUTICA

Em 1962, Newton classificou a estomatite protética em três estágios de acordo com sinais clínicos da infecção: (I) Hiperemia puntiforme: caracteriza-se pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos nos ductos das glândulas salivares palatinas menores; (II) Hiperemia difusa: refere-se à inflamação generalizada sobre a mucosa recoberta pela prótese, que se apresenta lisa e atrófica e (III) Hiperemia granular: a mucosa encontra-se hiperêmica, com aparência nodular, que pode estar presente em toda a região recoberta pela prótese ou, mais frequentemente, restrita à região central do palato, sobretudo nas áreas sob câmara de sucção de próteses totais. A estomatite não tratada pode progredir do estágio I para o II, e deste para o III. Newton sugeriu que o nível da inflamação está relacionado com o acometimento dos ductos salivares, uma vez que os tecidos periductais são menos resistentes aos processos inflamatórios.

O estudo de Davenport (1970) avaliou a distribuição e a concentração de *Candida* em pacientes com estomatite protética. Para o estudo, foram selecionados 50 pacientes com estomatite protética e 50 pacientes sem alteração da mucosa bucal (controle). Foram realizados exames citológicos por esfregaço da mucosa palatina e da superfície interna das próteses removíveis, parciais ou totais, de todos os pacientes. Para a diferenciação de *C. albicans* de outras espécies, amostras de saliva estimulada dos pacientes foram cultivadas em ágar CornMeal e soro de cavalo. A presença de *Candida* na mucosa palatina e na superfície interna das próteses foi também avaliada nas culturas em placas de ágar Sabouraud. Em dez pacientes, foram realizadas biópsias da mucosa palatina inflamada. A análise dos esfregaços das próteses demonstrou a presença de leveduras em 94% dos pacientes com estomatite protética e em 30% dos pacientes do grupo controle. A avaliação quantitativa dos esfregaços demonstrou maior número de células de *Candida* nos esfregaços obtidos das próteses em relação aos obtidos das mucosas palatinas. As culturas das amostras de saliva revelaram a presença de *C. albicans* em 70% dos pacientes com estomatite protética e 14% dos pacientes do grupo

controle. As culturas em ágar Sabouraud demonstraram o mesmo padrão de distribuição de *Candida* obtido com os esfregaços. Não foram observadas células de *Candida* em nenhuma das secções das biópsias obtidas. O autor sugeriu que a estomatite protética está associada à proliferação de *Candida*, a qual é primariamente associada à presença de biofilme na superfície interna das próteses.

A importância da *C. albicans* na patogenia da estomatite protética foi discutida por Budtz-Jørgensen (1974). Segundo o autor, a presença de próteses removíveis, parciais ou totais, na cavidade bucal é considerada um fator predisponente primário para o desenvolvimento dessa patologia. Sua patogenia pode ser agravada pela infecção por *C. albicans*, comumente associada à utilização de próteses com bases acrílicas. Apesar da infecção fúngica ser facilmente tratada, as recorrências são frequentes e o comprometimento de outras áreas da cavidade bucal, como língua e comissura labial, é habitualmente verificado. Em indivíduos saudáveis, a estomatite protética não é considerada uma condição patológica grave. Entretanto, a candidose bucal pode evoluir para quadros de infecções sistêmicas em pacientes debilitados, principalmente quando submetidos a terapias prolongadas com antibióticos, corticosteróides ou medicamentos imunossupressores. Os efeitos patogênicos das espécies de *Candida* estão ligados à degradação da superfície epitelial da mucosa pela ação de enzimas e ao desenvolvimento de resposta hipersensitiva tardia. As endotoxinas produzidas por *Candida* spp. podem agravar as lesões decorrentes do uso de próteses removíveis. Considerando a significância das espécies de *Candida* no desenvolvimento da estomatite protética, o autor sugeriu ser imprescindível prevenir a colonização da mucosa palatina e da superfície protética por estes micro-organismos. As seguintes medidas de prevenção foram citadas: higienização adequada das próteses, cuidados com a higiene bucal, eliminação de traumas locais e remoção das próteses no período noturno. Para a recuperação das mucosas infectadas, a terapia antifúngica tópica pode ser recomendada, porém, para o tratamento de estomatite protética, é necessário que o método promova a eliminação de *Candida* spp. da superfície interna das próteses.

Em 1979, o estudo de Arendorf e Walker teve por objetivo determinar a densidade e a frequência de colonização por *C. albicans* na mucosa bucal e na superfície interna de próteses totais. Foram avaliados 52 pacientes com estomatite protética e 60 sem alterações na cavidade bucal. A avaliação da presença de *C. albicans* na mucosa bucal também foi realizada em 60 indivíduos dentados

saudáveis. Na técnica de impressão utilizada pelos autores, esponjas estéreis, cortadas em quadrados, foram umedecidas em caldo de Sabouraud. Em seguida, as esponjas foram individualmente mantidas por 60s em contato com vários sítios da mucosa bucal e da superfície interna das próteses totais. As esponjas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Sabouraud e incubadas a 37°C por 48h. Após a incubação, a frequência e a densidade de colônias de *Candida* spp. foram calculadas em unidade de área para cada sítio avaliado. A *C. albicans* foi diferenciada de outras espécies por testes de fermentação e assimilação de carboidratos e formação de tubo germinativo e clamidósporo. Os resultados demonstraram que a distribuição de *C. albicans* foi variável entre os pacientes usuários de próteses sem alteração na cavidade bucal. Para os pacientes com estomatite protética, foi observada correlação entre a distribuição dessa espécie fúngica e os sítios infectados da mucosa bucal. Esses sítios apresentaram significativamente maiores frequências e densidades de *C. albicans* que aqueles dos usuários de próteses totais sem alteração na cavidade bucal. A densidade de colonização por *C. albicans* nos usuários de próteses totais sem patologias bucais foi significativamente maior do que nos indivíduos dentados. Segundo os autores, a técnica de impressão de culturas poderia ser utilizada para diferenciar os indivíduos portadores de micro-organismos do gênero *Candida* daqueles com candidose bucal, uma vez que houve um limite aparente de densidade fúngica em indivíduos dentados e usuários de próteses sem estomatite protética. Nos pacientes com essa infecção, as mais altas densidades de *Candida* foram observadas no palato, na língua e na superfície interna das próteses, sugerindo que a *C. albicans* deva ser considerada na patologia da estomatite protética. A presença de prótese total, particularmente associada à utilização no período noturno, foi correlacionada aos aumentos da frequência e da densidade de colonização por *Candida*.

Os fatores relacionados à etiologia e patogenia da candidose bucal bem como os métodos para tratamento e profilaxia dessa infecção foram discutidos por Budtz-Jørgensen em 1990. Segundo o autor, as espécies de *Candida* causam infecção por indução de hipersensibilidade ou produção de toxinas durante a invasão tecidual. A adesão das células microbianas às camadas epiteliais é condição determinante nos processos de colonização e infecção das superfícies mucosas por *Candida*. A adesão de *Candida* às células do epitélio, in vitro, pode ser influenciada por diversos fatores relacionados ao microrganismo (concentração, fase de crescimento, meio de

crescimento, espécies e cepas), às células epiteliais e às condições ambientais (temperatura, concentração de íons de hidrogênio, bactérias e anticorpos). A *C. albicans*, a mais patogênica das espécies de *Candida*, apresenta alta capacidade de se aderir firmemente às células epiteliais in vitro. Essa adesão parece envolver interações entre a porção proteica das manoproteínas localizadas nas fibrilas superficiais da levedura e os receptores de glicosídeo das células epiteliais. A adesão de *C. albicans* in vitro pode ser favorecida pela incubação prévia de células epiteliais com certas espécies de bactérias e pela adição de carboidratos ao substrato. Além das interações específicas com as células epiteliais do hospedeiro, outro aspecto que deve ser considerado na patogenia da *C. albicans* são as interações não específicas de afinidade e ligação desse microrganismo às resinas acrílicas das bases das próteses, o que frequentemente proporciona o desenvolvimento de estomatite protética. A adesão às resinas acrílicas é também favorecida por carboidratos, que pode ser considerado um importante fator na maioria dos casos de colonização de *Candida* imediatamente após a suspensão da terapia com antifúngicos. Após a adesão e colonização, as células de *Candida* invadem os tecidos pela ação de enzimas hidrolíticas. Com a invasão tecidual, inicia-se um processo de resposta inflamatória aguda caracterizada pela predominância de neutrófilos. As condições sistêmicas predisponentes para a candidose bucal envolvem fatores fisiológicos (idade avançada, infância, gravidez, menopausa), desordens endócrinas (diabetes, hipotireoidismo), deficiências nutricionais (deficiências de ferro, vitamina B e ácido fólico) e doenças e medicamentos que causem deficiências imunológicas ou imunossupressão (AIDS, corticoterapia, leucemia aguda). Entre as condições locais predisponentes para a candidose bucal foram citadas xerostomia, antibióticos de amplo espectro, fumo, dieta rica em carboidratos, leucoplasia, câncer bucal, uso de próteses, higiene bucal inadequada e traumas locais. De acordo com o autor, o tratamento para a estomatite protética deveria envolver cuidados com a higiene das próteses, remoção das mesmas da cavidade bucal durante a noite, imersão em clorexidina e terapia antifúngica tópica com nistatina, anfotericina B ou miconazol. A terapia com antifúngico sistêmico (fluconazol) deveria ser indicada apenas para os pacientes com imunossupressão.

McMullan-Vogel et al. (1999) avaliaram a distribuição de *C. albicans* (sorotipos A e B) e a sua secreção de proteinase ácida em isolados de pacientes com estomatite protética. Esses resultados foram comparados aos obtidos com

isolados de pacientes não usuários de próteses e com candidose bucal (HIV-negativos). Os autores também compararam os resultados dos isolados de pacientes com estomatite protética com os obtidos com isolados de *C. albicans* de pacientes HIV-positivos. Foram selecionados 99 pacientes usuários de próteses removíveis, totais ou parciais, com diagnóstico clínico de estomatite protética. Após a obtenção das culturas em ágar Sabouraud, as espécies de *Candida* foram identificadas por métodos fenotípicos confirmados pelo teste API 32-C. A sorotipagem das espécies identificadas como *C. albicans* foi avaliada por teste de aglutinação. Para a indução de secreção de proteinase ácida, uma alíquota de suspensão de *C. albicans* foi adicionada em meio de Remold incubado por seis dias. Os resultados demonstraram que a *C. albicans* foi isolada em 75% dos pacientes com estomatite protética. As outras espécies de *Candida* isoladas desses pacientes foram *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. A sorotipagem de *C. albicans* revelou que 75% dos isolados eram sorotipo A e 25% sorotipo B. As porcentagens de *C. albicans* sorotipo B dos pacientes com estomatite protética e dos pacientes HIV-positivos foram semelhantes entre si e significativamente maiores do que a porcentagem observada para os pacientes HIV-negativos. Todos os isolados de *C. albicans* dos pacientes com estomatite protética secretaram proteinase ácida. A atividade de secreção da proteinase foi dependente da idade (maior em idosos) e do gênero (maior em mulheres). Os isolados de *C. albicans* dos pacientes com estomatite protética e dos HIV-negativos apresentaram secreção de proteinase ácida semelhante e inferior à observada para os isolados dos pacientes HIV-positivos. Não foi observada correlação entre o sorotipo de *C. albicans* e a quantidade de proteinase ácida secretada, sugerindo que esses fatores patogênicos são independentes na candidose bucal. Os autores concluíram que o sorotipo B de *C. albicans* pode ser um fator patogênico na estomatite protética em decorrência da alta prevalência de pacientes com essa sorotipagem. Segundo os autores, apesar de a proteinase ácida secretada por *C. albicans* provavelmente estar envolvida na patogenia da estomatite protética, a atividade aumentada dessa enzima não parece ser o mecanismo patogênico.

Em 2002, Pires et al. avaliaram a associação entre estomatite protética e o fluxo salivar, bem como a quantificação e a identificação das espécies de *Candida*, antes e 6 meses após a substituição de próteses totais superiores. Foram avaliados 77 pacientes, com idade entre 36 e 84 anos, sendo a maioria mulheres (63,6%). A

estomatite protética foi classificada de acordo com os critérios de Newton e a higiene da prótese qualificada como boa, regular, deficiente ou inadequada. Para a determinação do fluxo salivar, amostras de saliva não estimulada foram coletadas dos pacientes durante 5min. Alíquotas das amostras coletadas foram semeadas em ágar Sabouraud e, após 48h de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias viáveis (UFC/mL). As espécies de *Candida* foram identificadas pelos testes de tubo germinativo, produção de clamidósporos e assimilação e fermentação de carboidratos. Todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal após a substituição das próteses totais e não foram medicados, sendo que, após 6 meses, retornaram para uma segunda avaliação na qual os mesmos procedimentos clínicos e laboratoriais realizados previamente foram repetidos. Os resultados demonstraram que, na primeira avaliação, 50,6% dos pacientes apresentavam estomatite protética e 63% demonstravam higienização inadequada das próteses. Na segunda avaliação, a porcentagem de pacientes com estomatite protética foi reduzida a 18,2% e a higienização das próteses foi considerada regular em 100% dos casos. Em ambas as avaliações, a prevalência de estomatite protética foi maior em pacientes do gênero feminino. O fluxo salivar dos pacientes variou de 0,02mL/min a 1,66mL/min e foi semelhante nas duas avaliações. Espécies de *Candida* foram identificadas em 84,4% dos pacientes na primeira avaliação e em 79,2% na segunda, sendo a maioria mulheres. Todos os portadores de estomatite protética apresentaram *Candida* spp. na saliva e o número de UFC/mL da maioria desses pacientes foi superior a 400. A *C. albicans* foi a espécie mais comum em ambas as avaliações (50%) e a associação mais encontrada foi entre esse micro-organismo e a *C. tropicalis* (15,4%). Os autores concluíram que a substituição das próteses e a melhora da higiene bucal promoveram a resolução dos sinais clínicos de estomatite protética. Entretanto, a persistência de elevada contagem de *Candida* spp. na saliva dos pacientes deveria ser considerada como um fator importante na recorrência da patologia. Foi sugerido que a substituição periódica das próteses e as instruções adequadas de higiene bucal são fundamentais para prevenir o desenvolvimento da estomatite protética.

A relação entre a presença de *C. albicans* e estomatite protética foi avaliada em 68 usuários de próteses totais superiores no estudo clínico de Barbeau et al. (2003). O tipo de estomatite protética foi determinado de acordo com a classificação de Newton, bem como por uma classificação modificada desenvolvida

pelos autores. Essa última classificação foi utilizada para determinar tanto o tipo quanto a extensão da inflamação nos tecidos acometidos por essa patologia. Para a avaliação clínica, foram realizadas três fotografias da região palatina de cada paciente. As leveduras foram coletadas da mucosa palatina e da superfície interna das próteses com *swab* oral e as suspensões obtidas foram cultivadas em ágar Sabouraud para contagem de colônias viáveis. Para a identificação das espécies de *Candida*, alíquotas das suspensões das colônias isoladas foram cultivadas em meio cromogênico (ChromAgar). Para a diferenciação final das espécies, as suspensões também foram submetidas à avaliação por um sistema comercial de identificação (ID *Candida*). Os resultados demonstraram que a presença de leveduras nas próteses não foi associada à estomatite protética de acordo com a classificação de Newton. Os maiores números de colônias e índices de biofilme nas próteses foram associados à maior extensão de inflamação, independentemente do tipo de estomatite protética segundo Newton. A presença de *C. albicans* e da associação de mais de uma espécie de *Candida* foi observada mais comumente nos usuários de próteses totais com estomatite protética. As espécies mais associadas com a *C. albicans* foram a *C. tropicalis* e a *C. glabrata*. A utilização contínua das próteses e o uso de tabaco foram considerados fatores de risco associados à extensão da inflamação observada nos pacientes com estomatite protética. Os autores concluíram que a presença de leveduras nas próteses foi significativamente relacionada à extensão da inflamação e não ao tipo de estomatite protética segundo a classificação de Newton. Foi sugerido que a colonização por *Candida* spp. foi favorecida pelo processo de inflamação causado pela estomatite protética e que, portanto, deveria ser considerada no diagnóstico e tratamento dessa patologia.

O objetivo do estudo de Baena-Monroy et al. (2005) foi avaliar a prevalência de *C. albicans*, *S. aureus* e *Streptococcus mutans* na mucosa palatina e na superfície interna das próteses totais de pacientes com e sem estomatite protética, bem como estabelecer fatores predisponentes dessa patologia. Para medir o pH salivar, amostras de 2mL de saliva foram coletadas de 105 pacientes. Além disso, o material presente na mucosa palatina e na superfície interna das próteses totais superiores dos pacientes foi coletado com algodão estéril. Para o isolamento e a identificação de *C. albicans*, foi utilizado um meio cromogênico (CandiSelect) específico para crescimento fúngico. Os meios seletivos selecionados para o isolamento e a identificação de *S. aureus* foram ágar Chapman ou ágar manitol

salgado. O *S. mutans* foi identificado por meio de semeadura em placas de Petri contendo ágar mitis salivarius. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48h. Após essa identificação inicial das bactérias, foram realizadas as provas enzimáticas de catalase e coagulase. Os autores observaram colônias viáveis de *C. albicans* nas placas referentes à mucosa palatina de 54 pacientes, dos quais 43 apresentavam estomatite protética. As culturas em CandiSelect também demonstraram a presença desse micro-organismo na superfície interna de 70 próteses. O *S. aureus* foi isolado da mucosa palatina de 55 pacientes, sendo 42 desses portadores de estomatite protética. Esse micro-organismo também foi isolado da superfície interna de 52 próteses. As culturas da mucosa palatina de 71 pacientes demonstraram a presença de *S. mutans* e desses, apenas 8 apresentaram estomatite protética. Os resultados também demonstraram elevada acidez do pH da saliva nos pacientes com estomatite protética bem como nos indivíduos que adotavam dieta rica em carboidratos. A presença simultânea de *C. albicans* e *S. aureus* foi observada na mucosa palatina de 39 pacientes do total de 50 que apresentavam estomatite protética. Essa infecção, assim como a colonização microbiana da mucosa palatina e das próteses, foram encontradas preferencialmente em indivíduos do gênero feminino e nos portadores de diabetes mellitus e hipertensão arterial, evidenciando a etiologia multifatorial desse tipo de candidose bucal. Os autores concluíram que o tratamento da estomatite protética deveria reduzir tanto a presença de fungos quanto a de bactérias uma vez que foi observada a presença de biofilmes mistos na mucosa palatina e superfície interna das próteses totais de pacientes com essa patologia.

A revisão de literatura de Salerno et al. (2011) foi realizada com o objetivo de descrever a associação de *Candida* com a estomatite protética. A *C. albicans* é uma levedura gram-positiva capaz de viver como comensal na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo a mais comumente encontrada em isolados clínicos. De acordo com alterações locais (traumas, pH da saliva, uso de próteses e presença de placa microbiana) e sistêmicas (diabetes, deficiências nutricionais, disfunções renais e xerostomia), as espécies de *Candida* podem se tornar virulentas, causando a infecção conhecida como candidose bucal. Tem sido demonstrado que a presença de próteses removíveis é um fator predisponente para o desenvolvimento dessa infecção, visto que a *C. albicans* é capaz de se aderir à superfície protética tanto quanto à mucosa. Por isso, o acúmulo de biofilme microbiano e uma higienização

inadequada contribuem para a virulência dessa espécie de *Candida*, que é capaz de se proliferar em tecidos duros e moles da cavidade bucal, unindo-se a bactérias e formando um biofilme complexo e heterogêneo. Como estratégias terapêuticas, têm sido adotadas as medicações antifúngicas tópicas e/ou sistêmicas e a limpeza das próteses por ação mecânica e outros métodos como utilização de antissépticos, desinfetantes e irradiação por micro-ondas. A candidose pode se manifestar em diferentes sítios da cavidade bucal, estando presente em 60% dos usuários de prótese removíveis. Embora a *C. albicans* seja a espécie mais comumente associada a esta patologia, outras espécies como *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis* e, sobretudo, *C. glabrata* também tem sido encontradas com frequência em isolados clínicos. De acordo com os achados da literatura, os autores concluíram que o tratamento da candidose bucal e, em especial, a estomatite protética, é complexo devido a sua etiologia multifatorial, sendo necessária a atuação em cada fator etiológico.

Sanitá et al. (2011) compararam a prevalência de *Candida* spp. entre usuários de próteses totais portadores ou não de diabetes mellitus. Foram selecionados 90 pacientes saudáveis, sem diabetes ou estomatite protética como grupo controle, 80 pacientes não diabéticos e com diagnóstico de estomatite protética e 40 pacientes com estomatite protética e diabetes tipo 2 controlado. Os históricos médico e odontológico de cada paciente foram avaliados e informações como idade, gênero, uso de medicamentos, tabagismo e tempo de uso da prótese foram recolhidas. Exames bucais clínicos detalhados foram realizados pelo mesmo investigador e as características da mucosa de suporte foram classificadas de acordo com os critérios propostos por Newton: 0 (ausência de inflamação), tipo I (inflamação localizada simples), tipo II (inflamação generalizada simples) e tipo III (hiperplasia inflamatória). Amostras micológicas foram obtidas com *swab* oral da superfície interna das próteses totais superiores de todos os pacientes para a identificação da presença de *Candida* spp. Do material coletado, produziu-se uma suspensão que foi inoculada em ChromAgar e incubada a 30°C por 5 dias. As colônias foram então identificadas por testes bioquímicos e os resultados mostraram que a *C. albicans* foi a espécie predominante, com prevalência em 81,9% dos pacientes, seguida pela *C. tropicalis* e pela *C. glabrata*, com prevalência de 15,71% e 15,24%, respectivamente. Os autores observaram que as complexas interações entre estas três espécies não são bem definidas, mas os resultados sugeriram que uma relação sinérgica pode estar

envolvida, aumentando o potencial patogênico dessa combinação. A prevalência dessas espécies de *Candida* foi significativamente maior nos grupos de pacientes com estomatite protética, quando comparados aos do grupo controle. Outras espécies de *Candida* foram identificadas em todos os grupos, mas não foram encontradas diferenças entre pacientes diabéticos e saudáveis em relação à prevalência de *Candida* spp.

Gendreau e Loewy, em 2011, realizaram uma revisão de literatura sobre a epidemiologia e etiologia da estomatite protética e a relação dos materiais para base de prótese com essa patologia. Para isso, foi realizada uma busca no banco eletrônico de dados PubMed, o que incluiu associação do termo "estomatite protética" com outros relacionados à epidemiologia, etiologia e tratamento referentes a estudos em humanos realizados até novembro 2009. A prevalência de estomatite protética entre os usuários de próteses removíveis variou entre 15% a 77,5%. A epidemiologia dos estudos revisados identificaram vários fatores associados a essa patologia. Os fatores demográficos incluíram senilidade dos usuários das próteses, gênero feminino, tabagismo e doenças concomitantes que comprometem a função imunológica. Dos fatores relacionados à prótese propriamente dita, foram ressaltados o inadequado suporte, o qual pode exacerbar o trauma e a irritação da mucosa oral, além de outros como o uso de próteses antigas e/ou mal higienizadas, a presença de infecção microbiana patogênica (principalmente por *Candida*) e o uso contínuo das próteses, sobretudo as superiores. De acordo com a literatura revisada, os autores afirmaram que enquanto a maioria das lesões bucais relacionadas com *Candida* spp. são eventos agudos, as lesões crônicas quase sempre ocorrem no palato mole e estão associadas ao uso de próteses removíveis, sendo a *C. albicans* considerada a espécie mais prevalente. Outras espécies frequentes de *Candida*, mas menos prevalentes que a *C. albicans* incluem *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Tais espécies, contudo, não têm sido associadas a uma prevalência aumentada ou a um papel patológico na estomatite protética. Segundo os autores, a terapia antifúngica se mostrou eficaz no tratamento agudo da inflamação associada à estomatite protética, podendo aliviar seus sintomas clínicos. No entanto, a menos que haja uma melhoria na higiene da prótese e redução da contaminação por *Candida* nas superfícies da prótese, a eficácia desse tratamento se torna limitada e uma rápida recorrência da infecção pode ocorrer após a suspensão do medicamento. Os materiais para base de

próteses removíveis podem contribuir no aumento do risco de estomatite protética por apresentarem rugosidade e hidrofobicidade superficial, o que pode promover a fixação de micro-organismos, bem como o desenvolvimento do biofilme. Pelos trabalhos revisados, os autores concluíram que a estomatite protética afeta um grande percentual de usuários de próteses removíveis, sobretudo as totais. Essa patologia tem uma etiologia multifatorial e os principais fatores que podem aumentar significativamente seu risco são a higiene inadequada das próteses, a desadaptação e a colonização da superfície acrílica e mucosa subjacente pela *C. albicans*. A falta de manutenção e higiene deficiente das próteses leva ao rápido estabelecimento do biofilme na superfície da prótese, favorecendo a colonização por *Candida*. Próteses bem adaptadas, instruções claras de higiene, incluindo a adoção de um regime diário de limpeza, remoção das próteses durante a noite e informações sobre a importância das consultas de manutenção são de extrema importância na redução do risco para o desenvolvimento da estomatite protética. Por fim, segundo os autores, o tratamento dessa patologia parece depender de uma rigorosa rotina de limpeza das próteses e/ou substituição das mesmas em conjunto com a terapia antifúngica apropriada.

O estudo clínico randomizado de Mima et al. (2012) comparou a eficácia clínica e micológica da terapia fotodinâmica (PDT) com a terapia antifúngica tópica no tratamento da estomatite protética bem como identificou a prevalência das espécies de *Candida* envolvidas com essa patologia. Foram selecionados pacientes edêntulos, usuários de prótese total e com diagnóstico de estomatite protética (Faculdade de Odontologia de Araraquara), classificados de acordo com os critérios de Newton. Os critérios de exclusão foram definidos com base nos fatores que pudessem influenciar a viabilidade da *Candida* spp.: diabetes, anemia, imunossupressão, radioterapia e/ou quimioterapia, administração de antibióticos, antifúngicos ou esteróides nos últimos três meses. Utilizou-se a randomização estratificada para a obtenção dos dois grupos de estudo (n=20) de forma semelhante em relação aos fatores de risco que poderiam influenciar no prognóstico (idade das próteses, tabagismo, uso de medicamentos, hábitos de higiene das próteses totais e uso noturno). Para os pacientes do grupo controle (NYT), foi administrada a suspensão oral de nistatina tópica (100.000 UI), 4 vezes ao dia, durante 15 dias. No grupo experimental (PDT), o palato e as próteses dos pacientes foram pulverizados com 500mg/L de fotossensibilizador derivado da hematoporfirina (Photogem) e, após

30min de incubação, foram iluminados por um diodo emissor de luz a 455nm, 3 vezes por semana, durante 15 dias. Adicionalmente, todos pacientes foram orientados em relação à limpeza das próteses com escova e sabão de coco e à necessidade de remoção das mesmas durante a noite por todo o período do experimento (3 meses). Culturas micológicas quantitativas (UFC/mL) foram obtidas da mucosa palatina e da superfície interna das próteses totais e a severidade da infecção foi avaliada clinicamente por fotografias padronizadas dos palatos dos pacientes antes (0 dia), ao final (15 dias) e após 30, 60 e 90 dias do início do tratamento. Nesses mesmos períodos de avaliação, as espécies de *Candida* foram identificadas por testes bioquímicos nos dois grupos de tratamento. Os resultados demonstraram que ambas as terapias avaliadas reduziram significativamente os valores de UFC/mL de *Candida* spp. ao final do tratamento e após 30 dias do seu início. Apesar disso, a porcentagem do sucesso clínico demonstrada com a avaliação das fotografias foi maior para o grupo NYT (53%) em relação ao grupo PDT (45%). A espécie isolada mais prevalente em todos os períodos investigados foi a *C. albicans* (NYT=63,3%; PDT=54%), seguida, respectivamente, pela *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Os autores sugeriram que a terapia fotodinâmica proposta demonstrou ser tão efetiva para o tratamento da estomatite protética quanto a terapia convencional com nistatina tópica.

Martori et al., em 2014, determinaram os fatores de risco (locais e sistêmicos) para lesões da mucosa bucal relacionadas ao uso de prótese em uma população geriátrica. Oitenta e quatro usuários de próteses totais com 60 anos ou mais foram entrevistados por meio de um questionário que incluía informações sócio-demográficas, tais como idade, sexo, nível de escolaridade, renda e tipo de residência (institucionalizados ou não). Dados gerais de saúde, e comportamento, além de variáveis relacionadas ao uso das próteses também foram coletados. Todos os participantes utilizavam pelo menos uma prótese removível, eram cognitivamente capazes de responder aos questionários e não estavam em tratamento com antifúngicos. O exame clínico foi realizado para avaliar as características de rebordo e mucosa, presença de lesões associadas às próteses e as características das mesmas: tipo (total ou parcial), material de confecção (resina acrílica e/ou metal) e qualidade (integridade, retenção, estabilidade, oclusão e índice de placa). A estomatite protética, quando presente, foi classificada de acordo com os critérios de Newton. A saliva não estimulada dos participantes foi coletada por meio de dois

rolos de algodão dental colocados bilateralmente sob a língua durante 1min. As taxas de fluxo salivar foram calculadas em mL/min e o pH da saliva foi mensurado com tiras de papel de pH. Por fim, as próteses foram colocadas dentro de um frasco estéril com 100mL de soro fisiológico para agitação durante 2min em ultrassom. As leveduras foram isoladas a partir das amostras clínicas e cultivadas em placas de ágar Sabouraud. Estas foram incubadas a 37°C em condições aeróbicas durante 48h para quantificação do número de UFCs. Dos 84 participantes, 60 foram recrutados a partir de sete residências geriátricas e os demais de centros temporários de cuidados a pessoas idosas. A idade média dos participantes foi de 83,7 anos, sendo 75% da amostra composta por mulheres. Sessenta e cinco por cento dos participantes utilizavam pelo menos uma prótese total e 63% eram totalmente desdentados. Entre os participantes, 54% apresentaram pelo menos uma lesão relacionada à prótese. A queilite angular foi encontrada em 29 participantes, úlceras traumáticas em 13 participantes e estomatite protética em 12 deles (14%). A presença de qualquer estágio de estomatite protética foi positivamente associada ao baixo pH salivar e à presença de *Candida*. Os participantes que utilizavam a(s) prótese(s) durante a noite apresentaram uma maior incidência de estomatite (25%) em relação àqueles que a(s) retiravam para dormir (10%). A presença de pelo menos uma lesão na mucosa foi encontrada em 45 participantes, estando relacionada positivamente a fatores tais como o voluntário ser institucionalizado, baixo pH salivar, rebordos reabsorvidos, presença de *Candida*, baixa eficiência mastigatória, falta de estabilidade e retenção das próteses e presença de biofilme protético. De acordo com os resultados, os autores concluíram que várias características locais e sistêmicas relacionadas ao uso de próteses removíveis representaram fatores de risco independentes para o desenvolvimento de lesões na mucosa bucal relacionadas ao uso de próteses na população idosa avaliada.

2.2 INIBIÇÃO MICROBIANA X AGENTES DE LIMPEZA PARA PRÓTESES REMOVÍVEIS

O estudo de Budtz-Jørgensen e Løe (1972) teve por objetivo avaliar o efeito da desinfecção de próteses totais com clorexidina no tratamento da estomatite protética. Foram selecionados 53 usuários de próteses totais com sinais clínicos de

estomatite protética na mucosa palatina. Os pacientes foram instruídos a realizar a imersão de suas próteses por 15s, durante 14 dias, em uma das seguintes soluções: digluconato de clorexidina a 2% ou solução placebo (água deionizada com 0,1% de cloreto de quinina). Os pacientes foram orientados a não enxaguar suas próteses após a imersão, deixando-as secar a temperatura ambiente antes de retorná-las à cavidade bucal. Cada paciente foi avaliado por cinco vezes: antes, durante e ao término do tratamento e após uma e cinco semanas da suspensão do mesmo. A efetividade do tratamento foi avaliada clinicamente por fotografias da mucosa palatina dos pacientes. Foram obtidos também exames citológicos por esfregaços da mucosa palatina e da língua. Além disso, foram realizadas biópsias da mucosa palatina dos pacientes antes e imediatamente após o término do tratamento. A análise dos esfregaços obtidos antes do tratamento demonstrou a presença de *Candida* em 94% dos pacientes avaliados, sendo a *C. albicans* identificada em 90% dos casos. A presença de hifas foi observada em 79% dos esfregaços obtidos da mucosa palatina antes do tratamento. Após uma semana do término do tratamento, houve melhora clínica em 78% dos pacientes que realizaram a desinfecção das próteses com clorexidina. A solução de clorexidina promoveu eliminação das hifas de *Candida* em 90% dos esfregaços obtidos da mucosa palatina dos pacientes após duas semanas do término do tratamento. No entanto, as formas de blastóporos foram observadas em 75% dos esfregaços após o fim do tratamento. Antes do uso de clorexidina, 16 pacientes (59%) apresentaram hifas de *Candida* nos esfregaços obtidos da língua. Após o tratamento, somente cinco esfregaços da língua revelaram hifas. No entanto, a presença de blastóporos foi observada em 78% dos esfregaços da língua após o tratamento com clorexidina. A solução placebo não apresentou efeitos sobre as células de *Candida* e não promoveu melhora clínica da inflamação da mucosa palatina dos pacientes. Histologicamente, o tratamento com clorexidina produziu uma redução significativa das alterações epiteliais, reduzindo o grau de infiltração leucocitária e o acúmulo de glicogênio. Uma semana após o tratamento com clorexidina, a recorrência de hifas de *Candida* foi observada nos esfregaços dos palatos da maioria dos pacientes (69%). Após cinco semanas do término do tratamento com clorexidina, os esfregaços na mucosa palatina de todos os pacientes, exceto um, apresentaram hifas de *Candida*. Nesse mesmo período de avaliação, foi observada a presença de hifas em 75% dos esfregaços da língua. O tratamento com clorexidina produziu alteração de cor no epitélio da língua (cor

amarronzada) de dez pacientes e causou manchamento nas próteses de cinco deles.

Hennessey (1973) realizou vários pequenos estudos para avaliar as propriedades antibacterianas da clorexidina, usada tanto no tratamento como na prevenção de patologias bucais. O espectro bacteriostático do fármaco para diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas foi determinado pelo método convencional de diluição em ágar para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM). Para as bactérias do tipo cocos, as CIMs variaram de 0,19 a 2,0µg/mL. As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram as menos sensíveis à clorexidina (CIM ≥ 100µg/mL), seguidas pelas de *Salmonella* spp., que apresentaram CIMs intermediárias (4,65µg/mL). As cepas que exibiram menor sensibilidade à clorexidina foram as de *Escherichia coli* (CIM = 0,93µg/mL). Também foi observado que as CIMs foram dependentes do tamanho do inóculo, sendo necessárias concentrações superiores de fármacos quando maiores números de células foram testados. O autor também investigou a atividade bactericida da clorexidina para diferentes micro-organismos. Quando suspensões bacterianas foram expostas à clorexidina a 0,02% por 10min em temperatura ambiente, houve redução dos micro-organismos viáveis em 99,99% na maioria dos casos. A metade dessa concentração (0,01%) ainda foi efetiva em exercer atividade antibacteriana significativa. Esses testes foram realizados em água destilada, mas considerando a interferência dos fluidos biológicos sobre o potencial de ação de antimicrobianos, o autor avaliou o efeito da clorexidina em alguns meios específicos. Para o mesmo tempo de exposição (10min), quando o soro de cavalo foi utilizado ao invés da água, foi necessária uma concentração de clorexidina cerca de quatro vezes maior para produzir os mesmos efeitos sobre *P. aeruginosa*. A extensão da ação bacteriana da clorexidina também foi reduzida quando cepas de *S. mutans* foram cultivadas na presença de sacarose a 5%. Na tentativa de selecionar cepas resistentes de *E. coli* e *S. mutans*, o autor submeteu esses micro-organismos a várias exposições sucessivas de clorexidina e concluiu que esse resultado foi difícil de ser observado. Por outro lado, bactérias resistentes a ampicilina e estreptomicina foram facilmente encontradas. Esses achados laboratoriais foram confirmados in vivo com a observação da mesma susceptibilidade de micro-organismos intestinais de ratos a uma dose de 50mg/kg de clorexidina administrada por sonda gástrica diariamente por 28 dias. Entretanto, uma dose diária de 100mg/kg do fármaco pelo mesmo período rapidamente causou

enterite letal nos animais. O autor ainda realizou um pequeno estudo in vivo com três pacientes e observou que o uso de um enxaguatório bucal contendo digluconato de clorexidina a 0,2%, duas vezes ao dia, por sete semanas, resultou em uma pequena, mas significativa alteração na susceptibilidade dos micro-organismos salivares à ação bacteriostática do fármaco. Foi concluído que a clorexidina é um agente bactericida e bacteriostático de amplo espectro, embora seja mais eficaz contra bactérias gram-positivas. O autor sugeriu que a importância de se conhecer a susceptibilidade através da CIM está no fato de que doses subletais dos antimicrobianos podem levar ao desenvolvimento de micro-organismos resistentes aos mesmos.

Em 1975, Olsen avaliou os efeitos de terapias com clorexidina e/ou anfotericina B sobre o biofilme fúngico de pacientes com estomatite protética. Foram selecionados 100 pacientes usuários de prótese total superior, com sinal de inflamação no palato e exames positivos para culturas fúngicas relativas à mucosa palatina e a superfície interna das próteses. Os pacientes foram divididos em cinco grupos de acordo com os diferentes tratamentos adotados. O grupo 1 recebeu terapia oral placebo e foi instruído a imergir suas próteses apenas em água. O grupo 2 recebeu comprimidos de anfotericina B de 10mg e fez imersão das próteses em água. Para o grupo 3, utilizou-se comprimidos placebo e imersão das próteses em clorexidina a 2%. Já o grupo 4 utilizou comprimidos de anfotericina B e imersão das próteses em clorexidina a 2%. Para o grupo 5, foram administrados aos pacientes comprimidos de clorexidina a 5%, utilizando-se clorexidina a 2% para a imersão das próteses. As mesmas instruções terapêuticas foram dadas a todos os pacientes, os quais receberam 56 comprimidos de cada terapia e 1000mL de cada solução para imersão das próteses. Os pacientes foram instruídos a não utilizarem outros métodos de higienização. Os exames clínicos e microbiológicos foram realizados no dia anterior ao tratamento e após 14 dias do início do mesmo, sendo a reincidência analisada 14 dias após o fim da terapia. Para a semeadura em ágar, foram recolhidos materiais da superfície de toda a cavidade bucal dos pacientes bem como da superfície das próteses. Posteriormente, foram realizados esfregaços micológicos e as lâminas analisadas em microscópio ótico. Ao 14º dia de tratamento, a anfotericina B reduziu de forma significativa a quantidade de fungos na mucosa bucal, mas não alterou a colonização nas superfícies protéticas. A imersão em clorexidina resultou em redução significativa do número de micro-organismos, tanto

na mucosa quanto nas próteses. Após 14 dias do término do tratamento, a flora microbiana dos pacientes foi restabelecida. Os resultados levaram à conclusão de que o tratamento da superfície da prótese é tão importante quanto o da mucosa, devido à contaminação dos materiais das bases protéticas.

Dills et al., em 1988, realizaram um estudo para avaliar em dois experimentos clínicos a eficácia de produtos de limpeza para próteses removíveis na redução da viabilidade microbiana. Para o experimento I desse estudo, 14 pacientes tiveram suas próteses parciais removíveis higienizadas por escovação e ultrassom e deixaram de higienizá-las por 48h para, então, seguir tratamentos de limpeza aleatoriamente codificados em :1- Escovação (escova de dente Cury-Clean) com pasta para prótese (Dentu-Cream) por 30s; 2- Imersão em agente químico (Efferdent) por 12min a 45°C; 3- Escovação com pasta seguida de imersão na solução; 4- Nenhum tratamento. Para o experimento II da metodologia usada, 16 pacientes tiveram suas próteses totais limpas (escovação e ultrassom) e deixaram de higienizá-las por 72h para também seguir os tratamentos de limpeza do experimento I. Para os procedimentos microbiológicos, chumaços de algodão seco, friccionados sobre o biofilme das próteses, foram colocados em fluido de transporte redutor (RTF) e, então, em uma câmara anaeróbica. Assim, cada amostra foi vigorosamente agitada para a remoção do biofilme do algodão e as suspensões obtidas foram diluídas. Para o experimento I, as alíquotas das diluições foram semeadas em placas com Agar Schaedler suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado (meio não seletivo). Tais placas foram incubadas anaerobicamente por 72h para a contagem das UFCs. Para o experimento II, as alíquotas diluídas no meio não seletivo foram colocadas em quatro meios específicos: CVE (*Fusobacterium* spp.); Agar Mitis-Salivarius (*Streptococcus* spp.); Agar Mycosel (levedura) e Agar Veillonella (*Veillonella* spp.). Essas placas também foram incubadas por 72h, antes da contagem de colônias. De acordo com os resultados, todos os tratamentos realizados reduziram consideravelmente os micro-organismos em comparação ao grupo que não recebeu tratamento. A imersão no agente químico bem como a combinação de escovação à imersão reduziram mais micro-organismos que a escovação apenas. Entretanto, a combinação de tratamento não foi significativamente melhor que a imersão utilizada isoladamente. A escovação somente não resultou em significativa redução dos micro-organismos em comparação com o grupo que não recebeu tratamento. A solução de limpeza

mostrou ampla atividade antimicrobiana contra bastonetes gram-negativos (*Fusobacterium* spp.), cocos facultativos gram-positivos (*Streptococcus* spp.) e cocos anaeróbios gram-negativos (*Veillonella* spp.). Os resultados desse estudo evidenciaram a necessidade do uso de agente de limpeza em associação à escovação das próteses para efetivo controle do biofilme protético.

A eficácia antifúngica da nistatina, do acetato de clorexidina e de um polipeptídeo homólogo da histidina na superfície de uma resina acrílica para base de prótese foi avaliada in vitro por Spiechowicz et al. (1990). Trinta discos de resina acrílica termopolimerizável (20mm x 1mm) foram confeccionados e esterilizados com óxido de etileno para serem imersos nos antimicrobianos testados, simulando a armazenagem noturna das próteses removíveis em água. Metade (n=15) dos discos (pré-tratados) foi submetida aos tratamentos selecionados previamente à contaminação com *C. albicans*. Para isso, quatro discos foram armazenados por 8h em 20mL de um dos seguintes: nistatina de 100.000U/mL (suspensão oral), gluconato de clorexidina a 0,12% (Peridex) e poli-L-histidina de 1mg/mL solubilizada em ácido acético 0,04M. Após esse período, os discos pré-tratados com os antimicrobianos juntamente com 15 discos adicionais sem tratamento prévio foram individualmente colocados em placas de Petri contendo *C. albicans* (10^7 cels/mL) isolada de paciente com estomatite protética. Todos os discos inoculados foram mantidos em temperatura ambiente por 24h. Após esse período, durante 8h, seis discos pré-tratados foram expostos ao ar ambiente e seis armazenados em água destilada. Como controle, três discos pré-tratados e não contaminados foram também expostos ao ar por 8h. Doze dos discos de resina acrílica não pré-tratados foram primeiramente inoculados com *C. albicans* e, após enxague por 5min, submetidos por 8h aos mesmos procedimentos que os pré-tratados, ou seja, deixados ao ar, imersos em água destilada ou expostos a um dos antimicrobianos testados. Três discos não pré-tratados foram mantidos ao ar ambiente e serviram como controle. Para avaliar o efeito antifúngico dos fármacos, swabs orais foram friccionados na superfície de todos os discos de resina acrílica durante 1min e, então, submetidos às diluições seriadas. O crescimento de *C. albicans* foi monitorado por um colorímetro em comprimento de onda de 600nm. Foi evidenciado que, independentemente do momento do tratamento, a poly-L-histidina não inibiu a adesão e o crescimento de *C. albicans* tanto nos discos deixados ao ar quanto nos imersos em água por 8h, o que foi atribuído à falta de aderência desse

antimicrobiano à resina acrílica. Ao contrário desses resultados, a clorexidina aplicada nos discos antes ou após a contaminação com *C. albicans*, foi efetiva na prevenção da aderência e do crescimento fúngico à resina acrílica, mesmo após 8 dias. Tais resultados foram relacionados à rápida capacidade de união da clorexidina a esse substrato. O pré-tratamento com a nistatina apresentou resultados contraditórios haja vista que os discos secos ao ar demonstraram eficácia semelhante à da clorexidina. Entretanto, os discos pré-tratados e imersos em água não evidenciaram inibição fúngica efetiva, o que também foi observado quando a nistatina foi aplicada aos discos acrílicos após a contaminação com *C. albicans*. Segundo os autores, isso ocorreu porque a nistatina, durante o pré-tratamento provavelmente tenha formado uma fina camada sobre a superfície de resina acrílica, a qual foi removida com a imersão em água. Os autores concluíram que, entre os tratamentos testados e para todas as condições estudadas, o acetato de clorexidina a 0,12% foi o único capaz de eliminar a *C. albicans* da resina acrílica termopolimerizável para base de prótese.

O objetivo do estudo de Lal et al., em 1992, foi avaliar a efetividade da solução de clorexidina a 0,12% no tratamento da estomatite protética. Para a seleção dos pacientes, o material presente na superfície interna das próteses totais superiores dos pacientes foi coletado com *swab* oral. As suspensões obtidas com as coletas foram cultivadas em placas de Petri para o crescimento das colônias viáveis de *C. albicans*. Réplicas seletivas da superfície interna das próteses foram obtidas em ágar. Foram selecionados cinco pacientes com presença de *C. albicans* nas próteses totais superiores e com diagnóstico clínico de estomatite protética na região palatina. Os pacientes foram instruídos a realizar bochechos com a solução de clorexidina por 30 a 60s, duas vezes ao dia, durante 24 dias. Nesse mesmo período, os pacientes também imergiram diariamente suas próteses totais superiores na solução de clorexidina durante a noite. Após 14 dias do início do tratamento, as réplicas da superfície interna das próteses foram novamente obtidas, e a mucosa palatina dos pacientes foi fotografada. Após 24 dias de tratamento, os pacientes foram aconselhados a higienizar suas próteses apenas com creme dental e agente de limpeza (Efferdent ou Polident). As réplicas em ágar foram repetidas após cinco semanas da suspensão do tratamento com clorexidina. Após 14 dias de tratamento com clorexidina, houve redução significativa da inflamação presente nas mucosas palatinas dos pacientes. Nesse mesmo período, não houve crescimento de colônias

viáveis de *C. albicans* nas placas de Petri referentes às próteses totais superiores. As culturas obtidas após cinco semanas da suspensão do tratamento com clorexidina demonstraram recorrência de *C. albicans* nas próteses. Para todos os pacientes, as áreas de infecção por *C. albicans* observadas nas réplicas das próteses durante a fase de recorrência corresponderam às áreas observadas antes do início do tratamento com clorexidina. Além disso, clinicamente, a inflamação da mucosa palatina dos pacientes aumentou após a suspensão do tratamento. Como não foram realizadas culturas das mucosas palatinas dos pacientes, os autores não puderam concluir se a inflamação observada após a suspensão do tratamento foi decorrente da sobrevivência de *Candida* nessa região. Os autores sugeriram que, aparentemente, existem áreas nas superfícies internas das próteses que favorecem a aderência e a colonização por *Candida*. Essas áreas são determinadas pelas propriedades físicas e químicas das resinas acrílicas das bases das próteses. Dessa forma, as áreas de recorrência da mucosa palatina via prótese podem ser, ao menos em parte, associadas às áreas das bases de resina acrílica com maior densidade de aderência e colonização por *Candida*. A higienização das próteses com os agentes comerciais Efferdent e Polident não foi considerada adequada após a suspensão do tratamento com clorexidina, uma vez que não preveniu o aumento da inflamação da mucosa palatina e a recorrência por *C. albicans*. Como houve recorrência da infecção após a suspensão do tratamento com clorexidina, os autores sugeriram que a utilização diária e contínua da solução de clorexidina como enxaguatório bucal e agente de limpeza de prótese poderia ser mais efetiva para o tratamento da estomatite protética. No entanto, como a clorexidina requer prescrição, a sua utilização deveria ser recomendada apenas nos casos mais severos dessa patologia.

O estudo de Chau et al.(1995) avaliou a possibilidade de penetração de micro-organismos na resina acrílica após curto período de exposição. Os corpos de prova de três resinas acrílicas foram polidos apenas em uma de suas faces para simular as superfícies externa e interna (não polida) de uma prótese. Em seguida, os corpos de prova foram imersos por 24h em um meio de cultura contendo bactérias gram-positivas e gram-negativas. Após a contaminação, os corpos de prova foram imersos em uma das soluções desinfetantes avaliadas (iodóforo, dióxido de cloro e hipoclorito de sódio a 0,525%) ou em uma solução salina estéril por 10min (controle). Os dois lados dos corpos de prova desinfetados foram submetidos à

coleta de material para as semeaduras em placas de Petri incubadas a 37°C por 48h. Os autores observaram, pela análise das culturas, que os corpos de prova tratados com iodóforo ou dióxido de cloro apresentaram um número de colônias significativamente inferior ao número apresentado pelos corpos de prova do grupo controle. Por outro lado, os corpos de prova imersos em hipoclorito de sódio não apresentaram colônias viáveis nas placas de Petri. Os autores concluíram que a resina acrílica pode ser contaminada com bactérias tanto na parte externa quanto na interna e que o tratamento com hipoclorito de sódio foi eficiente para inativação microbiana.

Webb et al., em 1998, avaliaram a efetividade da irradiação por micro-ondas e da imersão em hipoclorito de sódio na desinfecção de próteses totais superiores. Após a esterilização em autoclave, as próteses foram inoculadas com *C. albicans* ou *Streptococcus gordonii* e incubadas a 37°C. Em seguida, metade das próteses de cada micro-organismo foi utilizada como controle (não irradiadas), sendo imersas em solução salina. As próteses submetidas à desinfecção por micro-ondas foram expostas a 350W ou 604W por 1, 2, 4, 6, 8 ou 10min. As próteses selecionadas para desinfecção química foram imersas por 8h em solução de hipoclorito de sódio a 1%, 0,02% ou 0,0125%. Todas as próteses foram submetidas aos procedimentos de semeadura em placas de Petri. Algumas amostras em resina acrílica de cada condição foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados evidenciaram que a irradiação em micro-ondas por 6min foi efetiva na inativação de *C. albicans* e *S. gordonii*, apesar não ter removido os micro-organismos não viáveis das superfícies acrílicas, conforme observado nas fotomicrografias. Além disso, a imersão das próteses por 8h em hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,02% e 0,0125% inativou as células de *C. albicans* e reduziu o crescimento de *S. gordonii*, removendo parte dos micro-organismos das superfícies das amostras. Os autores concluíram que a irradiação por micro-ondas por 6min foi mais efetiva para a desinfecção de próteses que a imersão em hipoclorito de sódio, apesar de nenhum procedimento eliminar todos os micro-organismos das superfícies

Banting e Hill, em 2001, avaliaram in vivo a desinfecção de próteses totais por imersão em clorexidina ou irradiação em micro-ondas como métodos adjuntos no tratamento de estomatite protética. 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 de 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 antisséptico e água e então irradiadas por 1min a 850W em 3 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 irradiadas por micro-ondas apresentaram pseudohifas de *C. albicans* e que essa porcentagem aumentou para 84% para as próteses imersas em clorexidina. Por outro lado, após esse mesmo período, os esfregaços citológicos referentes à mucosa palatina dos pacientes cujas próteses foram irradiadas apresentaram um quarto 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* em comparação com o 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 nas próteses sem ocasionar efeitos deletérios aparentes nas propriedades das mesmas.

O estudo de Barnabé et al. (2004) avaliou a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 0,05% associado à escovação das próteses com sabão de coco na redução dos sinais clínicos da estomatite protética e na inibição do crescimento de *C. albicans* e *S. mutans*. Inicialmente, 60 pacientes usuários de próteses totais superiores foram divididos igualmente em dois grupos, de acordo com o tratamento realizado: G1 (placebo)- escovação das próteses com sabão de coco seguida pela imersão das mesmas em 200mL de água filtrada por 10min e G2- escovação das próteses com sabão de coco seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% por 10min. Os pacientes foram instruídos a realizarem os tratamentos uma vez ao dia por 15 dias. Dos 60 pacientes iniciais, 28 retornaram para a avaliação após 15 dias do início do tratamento. Dessa forma, somente esses pacientes foram incluídos na pesquisa, sendo 9 do G1 e 19 do G2. O biofilme presente nas próteses totais dos pacientes selecionados foi coletado com escova de

dente estéril antes e após 15 dias do início dos tratamentos. Após cada coleta, as escovas foram individualmente imersas em 10mL de solução salina por 1min e a solução resultante foi semeada em placas de Petri com os meios seletivos para as duas espécies de micro-organismos testadas (*C. albicans* e *S. mutans*). Antes e após 15 dias do início dos tratamentos, a mucosa palatina de cada paciente também foi avaliada clinicamente de acordo com a classificação de Newton. Os resultados demonstraram que, dos 28 pacientes avaliados, 19 (67,85%) apresentaram sinais clínicos de estomatite protética antes do início dos tratamentos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos dos grupos de estudo em relação à redução dos micro-organismos avaliados. Todos os pacientes apresentaram redução dos sinais clínicos de estomatite protética. No entanto, as culturas das próteses dos pacientes dos dois grupos de estudo não evidenciaram redução significativa da quantidade de *C. albicans* e *S. mutans* após 15 dias de tratamento. Os autores concluíram que, apesar de não ter reduzido a viabilidade dos micro-organismos, a imersão das próteses em hipoclorito de sódio a 0,05% associada à escovação com sabão de coco promoveu um controle efetivo do biofilme presente nas mesmas.

No ano de 2005, Webb et al. avaliaram a eficácia de dois métodos para tratamento de estomatite protética em indivíduos de instituições de cuidados a idosos. Residentes usuários de próteses totais superiores e inferiores de 20 diferentes instituições foram avaliados em relação à estomatite protética. Sessenta indivíduos com essa patologia foram selecionados e divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com o tratamento das próteses: imersão em hipoclorito de sódio a 0,02% durante a noite por 7 dias, desinfecção por micro-ondas a 350W durante 10min uma vez ao dia por uma semana ou apenas cuidados rotineiros adotados pela instituição (controle). A coleta das amostras microbiológicas foi realizada na mucosa palatina por meio de *swab* oral estéril e nas próteses totais superiores e inferiores por imersão em salina seguida de agitação em ultrassom durante 60s. As diluições das amostras microbiológicas foram semeadas em placas de cultura contendo meio específico para *Candida* (ágar Sabouraud) ou bactérias aeróbicas (Columbia suplementado com ágar sangue). As espécies de *Candida* foram identificadas pelo sistema comercial ID32C associado a exame microscópico e testes de catalase e oxidase. Para a avaliação clínica, foram tomadas fotografias padronizadas dos palatos dos pacientes da pesquisa, as quais foram avaliadas por

três examinadores independentes. Os procedimentos microbiológicos e clínicos foram realizados antes e ao final dos tratamentos propostos. Na população idosa institucionalizada avaliada no estudo, os autores encontraram uma frequência de 33,7% de estomatite protética. Desses pacientes, 46,7% removiam suas próteses durante a noite e apenas 10% eram fumantes, sendo a idade média de 83,7 anos. Os resultados microbiológicos revelaram que a imersão em hipoclorito de sódio e a desinfecção das próteses por micro-ondas reduziram significativamente o número de *Candida* e bactérias aeróbias sobre a superfície das próteses totais superiores e inferiores. Embora tenham reduzido de forma significativa o número de *Candida* nos palatos dos pacientes, os métodos de desinfecção testados não alteraram a quantidade de bactérias aeróbicas presentes nestes sítios. Três espécies de *Candida* foram identificadas: *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, sendo a primeira a mais prevalente, encontrada em pacientes de 19 das 20 instituições avaliadas. O grupo controle não apresentou alterações significantes tanto para *Candida* quanto para bactérias isoladas da mucosa palatina e de ambas as próteses (superiores e inferiores). Os três examinadores independentes que avaliaram as fotografias dos palatos tiveram dificuldade em identificar os pacientes do grupo controle, mas obtiveram mais sucesso quando o fizeram para aqueles submetidos aos tratamentos. Os avaliadores também não identificaram diferenças entre a desinfecção química e por micro-ondas com relação à eficácia sobre as diferentes espécies de *Candida* identificadas. De acordo com os resultados microbiológicos obtidos, não houve diferença na eficácia dos tratamentos com imersão em hipoclorito de sódio e energia de micro-ondas, o que foi confirmado pela análise clínica dos examinadores. Além disso, os autores concluíram que ambos os métodos se mostraram igualmente eficazes em controlar as diferentes espécies de *Candida*, sendo, portanto, bem indicados para pacientes institucionalizados usuários de próteses totais, sobretudo pelo baixo custo e facilidade de utilização.

Em um estudo laboratorial, Montagner et al. (2009) investigaram a ação antifúngica de diferentes agentes químicos de limpeza para próteses sobre uma resina acrílica para base de prótese. Sessenta corpos de prova (10mm x 10mm x 5mm) de resina acrílica polimerizada por energia de micro-ondas foram confeccionados (Vipi Wave), inoculados com $1,5 \times 10^8$ cels/mL de *C. albicans* e incubados por 11h a 37°C. Então, os 60 corpos de prova foram distribuídos em cinco grupos experimentais e dois controles, de acordo com o tratamento de desinfecção a

que foram submetidos: Controle 1 (C1)- amostras inoculadas e submetidas à solução salina durante 10min; Controle 2 (C2)- amostras não inoculadas expostas à solução salina por 10min; Grupo 1 (G1) –solução de clorexidina a 2% durante 10min; Grupo 2 (G2)– solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 10min; Grupo 3 (G3) – solução de hipoclorito modificado (hipoclorito de sódio a 0,5% e álcool GL 96°- solução a 50% v/v) durante 10min; Grupo 4 (G4)– Pastilha efervescente de peróxido alcalino (Corega Tabs) por 5min; Grupo 5 (G5)- peróxido de hidrogénio a 10v durante 30min. Em seguida, com o intuito de impedir a ação contínua dos desinfetantes testados, cada amostra foi lavada com solução salina e transferida individualmente para tubos de ensaio contendo 5mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e neutralizadores (tiosulfato de sódio 0,6% para o hipoclorito de sódio e Tween 80 com lecitina 0,07% para a clorexidina). Após 24h de incubação, os tubos foram transferidos individualmente para um espectrofotômetro com 530nm de comprimento de onda para mensuração do grau de turvação por meio da transmitância. Aliquotas dos tubos foram inoculadas em placas de ágar Sabouraud (Oxoid) contendo 500mmol/L de sacarose e submetidas à incubação durante 24h a 37°C para o crescimento microbiano. A pureza das culturas positivas foi confirmada pela coloração de Gram, pela morfologia da colônia nas placas de ágar e pelo uso de sistema comercial de identificação bioquímica (API 20 C Aux). Os resultados mostraram que os corpos de prova não desinfetados assim como aqueles imersos na solução de clorexidina não apresentaram inibição do crescimento fúngico. De forma similar, o agente efervescente utilizado de acordo com as instruções do fabricante não foi eficaz na remoção das colônias de *C. albicans*. Por outro lado, os agentes contendo hipoclorito de sódio ou peróxido de hidrogénio na sua composição apresentaram uma ação antifúngica adequada. Os autores concluíram que, em até 10min de imersão, os agentes à base de hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio foram mais eficientes na inibição de *C. albicans* que a solução de clorexidina a 2% e o agente efervescente.

A efetividade da escovação com diferentes soluções de limpeza para próteses na eliminação de biofilme de *C. albicans* foi avaliada por Pellizzaro et al., em 2012. Para isso, foram confeccionados 90 corpos de prova (10mm x 2mm) de resina acrílica para base de prótese (VipiWave), os quais foram individualmente armazenados em água destilada a 37°C por 48h e, então, esterilizados em micro-ondas por 3min a 650W. O inóculo de *C. albicans* foi subcultivado em ágar

Sabouraud e incubado a 37°C durante 48h. As suspensões de *Candida* foram espectrofotometricamente padronizadas para uma densidade óptica a 520nm a uma concentração final de 10^7 cels/mL. Os corpos de prova foram colocados individualmente no interior de um dos 24 poços de placas de cultura contendo 2mL da suspensão padronizada de células fúngicas. Para o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* sobre os corpos de prova de resina acrílica, as placas foram incubadas durante 90min (fase de aderência) a 37°C num agitador orbital a 75rpm. Após 24h de incubação (37°C a 75rpm), o meio YNB (Yeast Nitrogen Base) foi removido, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS (Phosphate Buffer Solution) e um volume igual de YNB foi adicionado. As placas de microtitulação foram então incubadas durante mais 24h, resultando em um tempo final de incubação de 48h. Os corpos de prova (n = 90) foram aleatoriamente divididos em 10 grupos experimentais. No grupo controle, as amostras foram imersas em água destilada por 90s. Em cinco grupos, os corpos de prova foram submetidos a um método combinado de escovação com cinco diferentes agentes de limpeza: água destilada, dentífrico diluído em água deionizada; digluconato de clorexidina a 2%; agente à base de perborato de sódio (Polident) e hipoclorito de sódio a 1%. Para determinar a eficácia dos agentes de limpeza contra o biofilme *Candida*, independentemente do método mecânico, foram testados mais quatro grupos nos quais os corpos de prova foram submetidos apenas a um dos agentes de limpeza (10mL) por 90s. Amostras não higienizadas foram utilizadas como controle positivo. Os procedimentos de escovação foram realizados em uma máquina de escovação e, para cada ensaio, foram realizados 90 ciclos, o que corresponde a uma única escovação de 90s. O efeito dos métodos de limpeza sobre a viabilidade do biofilme foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de redução do XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxianilida]. Para isso, todos os corpos de prova foram lavados duas vezes com 2mL de PBS em placas de microtitulação e transferidos para novos poços contendo uma mistura de 1,580µL de PBS com 200mM de glucose, 400µL de XTT e 20µL de menadiona. As placas foram incubadas no escuro durante 3h a 37°C. Uma alíquota de 1mL da solução de cada poço foi transferido para um tubo e centrifugadas a 5000xg durante 2min. A alteração colorimétrica do sobrenadante foi medida utilizando um leitor de placas a 492nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três ocasiões independentes. Os resultados demonstraram que todos os métodos e agentes de limpeza apresentaram

redução estatisticamente significativa na viabilidade de biofilme quando comparados ao grupo controle. Foi também observado que a escovação com os agentes de limpeza foi significativamente mais eficaz na redução do biofilme fúngico em comparação apenas à imersão nos agentes de limpeza, com exceção dos corpos de prova imersos em clorexidina a 2%, onde não foi detectada viabilidade de *C. albicans*. A escovação com clorexidina a 2% e hipoclorito de sódio a 1% eliminou todas as células do biofilme fúngico. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que a ação mecânica da escovação associada aos agentes de limpeza demonstrou ser um método efetivo para a redução do biofilme de *C. albicans*. Entre as soluções químicas testadas, a clorexidina a 2% e o hipoclorito de sódio a 1% foram as mais efetivas, reduzindo 100% da viabilidade de *C. albicans*.

Altieri et al., em 2012, avaliaram a eficácia de duas soluções químicas e da irradiação por micro-ondas na desinfecção de próteses totais contaminadas com *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Trinta e seis próteses totais foram confeccionadas, armazenadas individualmente em um recipiente de 200mL com água destilada a 37°C durante 48h e esterilizadas em autoclave. Uma cepa padrão de MRSA (ATCC 33591) foi mantida isolada em meio TSB e congelada a -70°C até sua utilização. A suspensão bacteriana foi ajustada por um medidor de turbidez a uma densidade de 0,5 do padrão de McFarland, correspondente a 10^7 células/mL em 10mL de TSB. Uma alíquota de 100µL de suspensão bacteriana para cada 200mL de solução de TSB foi transferida e colocada assepticamente nas próteses estéreis, que foram incubadas durante 24h a 37°C num agitador orbital a 75rpm. Após isso, os autores quantificaram contagem das colônias e as próteses foram divididas em quatro grupos de estudo, sendo um controle positivo, onde as próteses não sofreram nenhum processo de desinfecção e três grupos experimentais. Nestes últimos, as próteses foram transferidas para béqueres e desinfetadas por diferentes agentes: 200mL de solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10min, 200mL de solução de gluconato de clorexidina a 2% por 10min e 200mL de água destilada estéril para irradiação por micro-ondas a 650W durante 3min. Após os processos de desinfecção, todas as próteses foram individualmente colocadas em béqueres estéreis, contendo 200mL de solução salina, centrifugadas e tiveram o número de micro-organismos determinado em cada diluição. Após incubação durante 48h, as colônias de leveduras de cada prótese foram quantificadas por um contador de colônias digital. Para verificar a eficácia a longo prazo dos três métodos de

desinfecção, cada prótese desinfetada foi transferida para um béquer estéril contendo 200mL de TSB, que foram incubados a 37°C durante 7 dias. Todas as próteses do grupo controle contaminadas com MRSA apresentaram crescimento microbiano substancial em 48h. As próteses que sofreram os processos de desinfecção não mostraram nenhuma evidência de crescimento microbiano em 48h, independentemente do método utilizado. Após 7 dias de incubação, não se observou turbidez nos béqueres contendo as próteses desinfetadas por meio de irradiação de micro-ondas ou que foram imersas em solução de gluconato de clorexidina a 2%. Para as próteses desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1%, observou-se turbidez em todos os béqueres após 7 dias de incubação. De acordo com os resultados observados, os autores concluíram que a desinfecção de próteses através da imersão em gluconato de clorexidina a 2% ou através de irradiação de micro-ondas, pode fornecer desinfecção de longa duração às próteses totais contaminadas com MRSA. Por outro lado, a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% foi eficaz apenas como um desinfetante de curto prazo.

Em um estudo similar Altieri et al., em 2013, analisaram a eficácia de dois agentes de limpeza e da irradiação por micro-ondas na desinfecção de corpos de prova acrílicos contaminados com biofilme de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Trinta e seis corpos de prova (10mm x 2mm) foram confeccionadas com uma resina acrílica para base de prótese (VipiWave) polimerizada em forno de micro-ondas a 500W durante 20min a 20% de potência, seguido de 5min a 90% de potência. Após 48h de armazenagem em água destilada a 37°C, todas as amostras foram esterilizadas com óxido de etileno. As suspensões de MRSA foram ressuspensas em TSB e espectrofotometricamente padronizadas em uma densidade óptica de 600nm, a uma concentração de 10^7 cels/mL. Os biofilmes foram desenvolvidos nos corpos de prova colocados em placas de microtitulação de 24 poços. Aliquotas de 2mL da suspensão de células de MRSA foram transferidas para as placas e estas foram incubadas durante 90min a 37°C num agitador orbital a 75rpm (fase de adesão). Em seguida, as células não aderentes foram removidas das amostras suavemente por lavagem com 2mL de PBS. Para a fase do biofilme, 2mL de TSB estéril foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C com agitação a 75 rpm durante 48h. Após 24h de incubação, o meio TSB foi removido, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e um volume igual de TSB fresco foi adicionado. As placas foram então incubadas durante mais 24h, resultando em um

tempo final de incubação de 48h. Após esse período, os corpos de prova foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento: não desinfetados (controle positivo); imersos em hipoclorito de sódio 1% por 10min; imersos em gluconato de clorexidina 2% por 10min e irradiados por micro-ondas a 650W durante 3min. O efeito dos procedimentos de desinfecção sobre a viabilidade do biofilme foi avaliado por ensaio de redução de XTT. Para isso, todas as amostras foram transferidas para placas de microtitulação, lavadas duas vezes com 2mL de PBS e colocadas em novos poços contendo a solução de XTT para incubação no escuro a 37°C por 3h. Uma alíquota de 1mL da solução de cada poço foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugadas a 5.000g durante 2min. A alteração colorimétrica do sobrenadante foi mensurada utilizando um leitor de placas de microtitulação a 492nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, dentro de três ocasiões independentes. Foi observado que todas as amostras do controle positivo contaminados com MRSA mostraram a formação de biofilme após 48h de incubação. Os corpos de prova desinfetados não mostraram nenhuma evidência de formação de biofilme, independentemente do protocolo de desinfecção utilizado. Todos os métodos de desinfecção reduziram 100% de viabilidade do biofilme em comparação ao controle positivo. Os autores concluíram que a desinfecção em hipoclorito de sódio a 1%, gluconato de clorexidina a 2% e irradiação em micro-ondas por 3 min a 650W mostraram-se eficazes na eliminação do biofilme maduro de MRSA sobre corpos de prova de resina acrílica.

2.3 IMERSÃO PROLONGADA EM AGENTES DE LIMPEZA X PROPRIEDADES DE MATERIAS PARA BASE DE PRÓTESE E DENTES ARTIFICIAIS

Pisani et al, em 2010, avaliaram o efeito a longo prazo de uma solução de limpeza experimental para prótese à base de *Ricinus Communis* em diversas propriedades de resinas acrílicas para base de prótese. Foram confeccionados trinta corpos de prova (14mm x 4mm) de duas resinas acrílicas termopolimerizáveis, sendo uma polimerizada convencionalmente em banho de água (Vipi) e a outra por energia de micro-ondas (Onda Cryl). Após imersão em água destilada durante 24h para eliminação do monômero residual, os corpos de prova de cada material foram

divididos aleatoriamente em três grupos: controle- imersão em água destilada a 37°C; controle positivo- imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% e experimental- imersão em solução de *Ricinus Communis*. Todas as soluções foram trocadas diariamente. Previamente à imersão nas soluções, os corpos de prova foram avaliados em relação à dureza Knoop, rugosidade, alteração de cor e resistência à flexão. Então, as amostras foram submetidas a 15 dias consecutivos de imersão nos agentes, simulando 3 anos de uso em um regime de higiene de 20min de imersão diária. Após esse período, as propriedades estudadas foram novamente avaliadas nos corpos de prova, os quais foram então submetidos continuamente a uma das soluções durante 183 dias, simulando 1,5 ano de regime de higiene diário de 8h de imersão por dia. Em seguida, os testes de dureza, rugosidade, alteração de cor e resistência à flexão foram novamente realizados. A dureza Knoop foi mensurada em aparelho Shimadzu HMV-2 com uma carga de 25g durante 5s, sendo a média de oito valores obtida em cada leitura. A média de três mensurações de rugosidade superficial foi obtida para cada corpo de prova com o auxílio de um rugosímetro SJ-201P. As alterações de cor (ΔE) dos corpos de prova foram mensuradas nos diferentes períodos avaliados sempre na mesma região por meio um espectrocolorímetro (BYK- Gardner GmbH) utilizando o sistema subtrativo de cor Lab, proposto pela Commision Internationale L'Eclairage (CIE $L^*a^*b^*$). A resistência flexural foi avaliada utilizando um teste de flexão de três pontos em uma máquina universal de ensaios (DL 2000) com uma carga de 50kgf a uma velocidade de 1mm/min. Em 15 dias de imersão em todas as soluções, houve redução da dureza para as duas resinas termopolimerizáveis, exceto pela resina acrílica polimerizada em banho de água após imersão na solução de *Ricinus Communis*. Os resultados demonstraram que o hipoclorito de sódio a 1% e a solução de *Ricinus Communis* reduziram significativamente a dureza de ambas as resinas acrílicas testadas em 183 dias de imersão. Não houve alteração significativa na cor dos materiais testados após 15 dias de imersão nas soluções avaliadas. Em 1,5 ano de regime simulado de limpeza, a maior alteração de cor ocorreu para a resina acrílica polimerizada convencionalmente com a imersão em água e solução de *Ricinus Communis*. Já para a resina polimeriza em micro-ondas, a solução de hipoclorito de sódio a 1% foi a que resultou na maior alteração de cor. A resistência à flexão de ambas as resinas acrílicas apresentou a maior e menor alteração de valores frente, respectivamente, às imersões por 15 dias em *Ricinus Communis* e hipoclorito de sódio. Em 183 dias

de imersão, houve diferença entre a resistência flexural dos materiais testados apenas com a imersão em hipoclorito, que resultou em menores valores para a resina polimerizada em micro-ondas. Os autores concluíram que ambas as soluções testadas causaram alterações nas propriedades analisadas nos dois períodos de imersão avaliados. Entretanto, no geral, o hipoclorito de sódio a 1% apresentou resultados melhores quando comparado à solução de *Ricinus communis*.

Em 2012, Pisani et al., avaliaram os efeitos da imersão prolongada em uma solução experimental de *Ricinus communis* a 2% sobre as propriedades de três marcas comerciais de dentes artificiais de resina acrílica. Trinta corpos de prova de cada marca comercial (VipiDent Plus, Biolux e Trilux) foram confeccionados a partir de incisivos centrais superiores e divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com a imersão em 200mL de uma das soluções testadas: grupo controle negativo (água destilada); grupo controle positivo (hipoclorito de sódio a 1%) e grupo experimental (solução de *Ricinus Communis* 2%). Para simular o período de 3 anos em regime de limpeza de prótese durante 20min por dia, os corpos de prova foram imersos em uma das soluções por 15 dias consecutivos. Após esse período, foram imersos até que se completasse 183 dias consecutivos para simular 1,5 anos de uso seguindo um regime de imersão de 8h por dia (uma noite). As soluções foram trocadas uma vez por dia para todos os protocolos. As avaliações da dureza Knoop, rugosidade superficial e alteração de cor foram realizadas imediatamente após a preparação de amostras e após os diferentes períodos de imersão testados. A dureza Knoop foi mensurada em aparelho Shimadzu HMV-2 com uma carga de 25g durante 5s e a rugosidade superficial foi obtida para cada corpo de prova com o auxílio de um rugosímetro SJ-201P. As alterações de cor das amostras foram mensuradas por um espectrocolorímetro (BYK- Gardner GmbH), sendo as medidas calculadas pelo espaço de cor CIE L*a*b*. Em 15 dias, foi observado que a solução de *Ricinus communis* aumentou a dureza dos dentes acrílicos ao passo que o hipoclorito de sódio e a água destilada causaram redução nos valores dessa propriedade. A imersão em todas as soluções durante 183 dias causou redução nos valores de dureza dos dentes artificiais, sendo as menores alterações observadas com a solução de *Ricinus communis*. A água destilada e o hipoclorito de sódio resultaram similarmente em redução da rugosidade superficial dos dentes avaliados enquanto que a solução de *Ricinus communis* causou aumento nos valores dessa propriedade. Em 183 dias, não foi observada diferença significativa entre as

soluções testadas para a rugosidade, mas sim entre os diferentes materiais. Neste período, os dentes Vipi e Trilux demonstraram redução na rugosidade ao passo que os dentes Biolux apresentaram-se mais rugosos. Não houve diferença de alteração de cor para as três soluções avaliadas, entretanto, a comparação entre os diferentes dentes acrílicos mostrou as menores variações para os dentes Biolux. Os autores concluíram que os protocolos de imersão testados com a solução de *Ricinus communis* a 2% e hipoclorito de sódio a 1% resultaram em alterações significativas das propriedades de dureza, rugosidade e cor dos dentes artificiais acrílicos avaliados.

Ainda em 2012, Pisani et al. observaram a estabilidade de cor, dureza e rugosidade de reembasadores resilientes para base de próteses removíveis, após imersão prolongada em diferentes agentes químicos de limpeza. Trinta corpos de prova de duas marcas comercial de reembasadores resilientes (Elite Soft Relining e Mucopren Soft), obtidos a partir de discos metálicos (14mm x 4mm), foram imersos aleatoriamente em água destilada a 37°C, hipoclorito de sódio a 1%, ou em uma solução experimental de *Ricinus communis*. Os corpos de prova foram imersos em cada uma das três soluções por um dos seguintes períodos: 15 dias (Protocolo 1), simulando 3 anos de uso em regime de higiene diário por 20min; 7 dias (Protocolo 2), simulando 1,5 ano de uso em regime de limpeza de 20min por dia; 183 dias (Protocolo 3), simulando 1,5 ano de uso em regime de limpeza de 8h por dia. A dureza foi mensurada utilizando-se um durômetro Shore A com uma carga de 1kg durante 5s. A média de três mensurações de rugosidade foi obtida para cada corpo de prova em um rugosímetro (SJ-201P). As alterações de cor foram mensuradas por um colorímetro (BYK- Gardner GmbH), sendo as medidas calculadas pelo espaço de cor CIE L*a*b*. Todos os testes foram realizados antes e após os períodos de imersão para cada grupo de estudo. O Mucopren Soft apresentou, nos três protocolos de imersão, maior aumento de dureza que o Elite Soft Relining. Para os protocolos 1 e 3, o hipoclorito de sódio foi o principal responsável pelo aumento de dureza de ambos os reembasadores. Após 7 dias de imersão (Protocolo 2), o Mucopren demonstrou aumento na rugosidade, ao passo que o Elite apresentou redução nos valores dessa propriedade. A solução de *Ricinus communis* resultou nas menos variações de rugosidade quando comparada à água e ao hipoclorito de sódio. Em 15 dias de imersão (Protocolo 1), ambos os materiais apresentaram aumento na rugosidade. Neste período, o reembasador Elite demonstrou maior

rugosidade que o Mucropen apenas para a imersão em água, não havendo diferenças entre os materiais para as demais soluções. Após 183 dias de imersão (Protocolo 3), o Elite apresentou maior variação na rugosidade comparado ao Mucropen e, em relação às soluções, o hipoclorito de sódio causou aumento na rugosidade enquanto que a água e solução de *Ricinus communis* resultaram em sua redução. Para os três protocolos simulados de higiene, o reembasador Elite apresentou maior alteração que cor que o Mucopren, sendo o hipoclorito de sódio o principal responsável por essa variação comparado à solução de *Ricinus communis*. Os autores concluíram que, para todas as propriedades analisadas, ambos os reembasadores resilientes (Elite Soft Relining e Mucopren Soft) foram mais estáveis após imersão em *Ricinus communis*. Em relação ao período de imersão, os melhores resultados foram observados com a simulação de 1,5 de uso das soluções testadas em um regime de 20min por dia.

O estudo de Paranhos et al. (2013) avaliou a estabilidade de cor, rugosidade superficial e resistência à flexão de uma resina acrílica para base de prótese após imersão noturna simulada de 1,5 ano em soluções de limpeza. Para isso, 140 corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável (Lucitone 550), sendo 60 circulares (16mm x 4mm) e 80 retangulares (65mm x 10mm x 3,3mm) foram distribuídos em quatro diferentes grupos: Controle 1 (C1): amostras sem imersão; Controle 2 (C2): imersão em água destilada por 8h; Experimental 1: Imersão por 8h em água morna contendo pastilha efervescente de peróxido alcalino (Corega Tabs); Experimental 2: imersão durante 8h em hipoclorito de sódio a 0,5%. As imersões foram realizadas para simular a rotina de higiene diária realizada pelo paciente durante 1,5 ano. Como o objetivo era simular a higiene noturna (*overnight*), cada dia (24h) correspondeu a três imersões de 8h, totalizando 182 dias contínuos de uso das soluções, as quais eram trocadas a cada ciclo de imersão. As amostras foram avaliadas quanto à cor, rugosidade superficial e resistência à flexão antes e após a simulação de limpeza por 1,5 ano. As alterações de cor foram obtidas com um colorímetro (BYK- Gardner GmbH) e uso do sistema de cor CIE L*a*b*. A rugosidade de cada amostra foi calculada por meio de um rugosímetro (SJ-201P), sendo utilizada a média aritmética de três mensurações (μm). A resistência à flexão foi avaliada por um teste de flexão de três pontos em máquina universal de ensaios (DL 2000) a uma velocidade de 5mm/min. Os resultados obtidos mostraram que a imersão em peróxido alcalino causou significativamente a maior alteração de cor na

resina acrílica. Os valores mais baixos de alteração de cor foram observados com a imersão das amostras em água, sendo valores intermediários obtidos com o hipoclorito de sódio. Quando comparado às demais soluções, o hipoclorito de sódio causou significativamente as maiores alterações na rugosidade da resina acrílica. Não houve diferença significativa entre as soluções testadas para a resistência à flexão do material avaliado. Os autores concluíram que a imersão em agentes de limpeza para prótese (peróxido alcalino e hipoclorito de sódio a 0,5%), simulando o protocolo de higiene noturna durante 1,5 ano, não alterou a resistência flexural de resina acrílica, entretanto, causou alterações de cor visíveis ao material. Além disso, a imersão prolongada em hipoclorito de sódio a 0,5% resultou aumento da rugosidade superficial da resina acrílica para base de prótese.

2.4 CITOTOXICIDADE DE AGENTES DE LIMPEZA E MATERIAIS PARA BASE DE PRÓTESES REMOVÍVEIS

2.4.1 MATERIAIS PARA BASE DE PRÓTESE

Com o objetivo de avaliar as diferentes respostas teciduais de resinas acrílicas para base de prótese, Kallus (1984) implantou amostras desses materiais no tecido subcutâneo de porquinhos-da-índia. As três resinas acrílicas selecionadas, sendo duas autopolimerizáveis (Palacast e Quick 20) e uma termopolimerizável (SR 3/60), foram testadas no interior de tubos de polietileno (2mm x 10mm) com as extremidades abertas. Após a implantação das amostras, animais sensibilizados com adjuvante completo de Freund (n= 27) foram divididos em três grupos distintos de acordo com o período experimental: 14 dias (n= 7), 30 dias (n= 7) e 90 dias (n=6). Os sete animais restantes não foram sensibilizados e receberam o implante subcutâneo das amostras pelo período de 30 dias, servindo como controle daqueles sensibilizados. No tecido subcutâneo de cada animal, foram implantados por uma única incisão três tubos contendo as diferentes resinas acrílicas testadas. Após a eutanásia, os tubos com o tecido circundante foram removidos para a realização das subseqüentes etapas para obtenção das lâminas histológicas. As análises

microscópicas compararam as secções finais dos tubos preenchidos com resina acrílica e as áreas de contato com os próprios tubos, utilizadas como controle. Nos períodos iniciais (14 e 30 dias), os autores observaram uma reação tecidual agressiva semelhante para os diferentes materiais testados, o que foi atribuído à maior concentração inicial de monômero residual. Como essa concentração diminuiu com o tempo, a reação tecidual também se apresentou menos acentuada ao final de 90 dias. A resina acrílica termopolimerizável foi considerada a mais biocompatível pelos autores por não resultar em efeitos inflamatórios moderados ou severos nos tecidos subcutâneos dos animais após 12 semanas.

Em 2001, Huang et al., determinaram a citotoxicidade *in vitro* de três diferentes extratos de resina para base de prótese e compararam o efeito citotóxico desses materiais sobre células epiteliais orais humanas e fibroblastos humanos primários derivados da mucosa bucal. Corpos de prova em forma de discos (2mm x 7mm x 35mm) foram confeccionados em triplicatas para cada tipo de resina acrílica, sendo uma autopolimerizável (Rebase), uma termopolimerizável (Lucitone 199) e uma fotopolimerizável (Triad). Os corpos de prova de cada material foram eluídos com meio de cultura por 1, 3 e 5 dias. A citotoxicidade das resinas foi determinada após 24h de incubação das células e dos eluatos, através do ensaio colorimétrico de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio], desenvolvido para monitorar, por meio de espectrofotometria, a sobrevivência e proliferação *in vitro* de células. Para isso, foram semeadas 1×10^4 cels/poço em uma placa de 96 poços e 100uL das diluições em série dos eluatos foram adicionados, permanecendo em contato com as células durante 24h. Após o tratamento, 50uL de solução de MTT foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada durante 4h a 37°C. Após a adição de 150uL de dimetil-sulfóxido em cada poço, as placas foram agitadas para que os cristais fossem dissolvidos. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em um leitor de placas de microtitulação a 650nm. Os eluatos das três resinas acrílicas testadas foram considerados citotóxicos às duas linhagens celulares avaliadas. O contato com a resina fotopolimerizável nos períodos experimentais mais extensos resultou em efeitos citotóxicos mais evidentes nas células epiteliais orais humanas. De uma forma geral, para ambas as linhagens de células, os maiores valores de citotoxicidade foram obtidos com os extratos da resina autopolimerizável, seguida pelas resinas termo e fotopolimerizável, respectivamente. Os resultados demonstraram que os efeitos citotóxicos observados

foram dependentes do tipo de resina acrílica para base de prótese e da linhagem celular avaliada.

A revisão da literatura de Jorge et al., em 2003, relatou a citotoxicidade de materiais para base de prótese, comparando diferentes tipos de resinas acrílicas, métodos e ciclos de polimerização. Esta informação é importante não só para avaliar os efeitos biológicos de tais materiais, mas também para permitir uma comparação entre os diferentes métodos de polimerização, auxiliando o clínico na escolha de um material com citotoxicidade mínima. A revisão da literatura foi realizada por meio de busca no Medline de artigos publicados entre 1973 e 2000, selecionados pela associação de efeitos citotóxicos aos materiais acrílicos para base de prótese. A citotoxicidade das resinas acrílicas é o resultado de substâncias de lixiviação, sendo o monômero residual considerado o principal eluato, o qual tem sido associado à irritação da mucosa e sensibilização dos tecidos. Pelos estudos revisados, foi observado que as resinas autopolimerizáveis são mais citotóxicas do que as termopolimerizáveis que, por sua vez, são mais citotóxicas do que as polimerizadas em micro-ondas. Em relação à polimerização em banho de água, foi sugerido que a quantidade de monômero residual pode ser reduzida com o ciclo de 7h a 70°C seguido de 1h a 100°C. Provavelmente, por causa de uma maior conversão de monômeros em polímeros, as resinas acrílicas polimerizadas por irradiação de micro-ondas são menos citotóxicas quando comparadas às resinas autopolimerizáveis. Além disso, o armazenamento de água foi sugerido para reduzir o nível de monômero residual, o que resulta em menor citotoxicidade a esses materiais. Embora os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade não possam ser imediatamente extrapolados para condições clínicas, estudos que os utilizaram são importantes na definição do comportamento biológico de materiais odontológicos e de seus componentes. Os testes de citotoxicidade permitem uma comparação entre os produtos e informação para a escolha de um material com adequados método e ciclo de polimerização dos materiais acrílicos disponíveis para base de prótese. Com base na revisão da literatura, concluiu-se que o efeito citotóxico das resinas acrílicas base de prótese pode ser relacionado com tempo de armazenagem em água, proporção pó-líquido, método e ciclo de polimerização.

Jorge et al., em 2004, compararam os efeitos de dois diferentes tratamentos térmicos na citotoxicidade de três resinas acrílicas para bases de próteses. Nove discos de cada resina termopolimerizável (Lucitone 550, QC 20 e

Acron MC) foram individualmente confeccionados (10mm x 1mm) e armazenados em água destilada durante 48h a 37°C. Após isso, as amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos de acordo com o tratamento térmico: irradiação por micro-ondas durante 3min a 500W; banho-maria a 55°C por 60min ou sem tratamento (controle). Previamente aos testes de citotoxicidade, os discos foram limpos em ultrassom com água destilada durante 20min e esterilizados por luz ultravioleta durante mais 20min. Após terem ou não recebido os tratamentos térmicos, três amostras de cada grupo de estudo foram colocadas dentro de tubos de ensaio com 9mL de meio de cultura Eagle, os quais foram incubados a 37°C por 24h para a obtenção dos eluatos. O teste de incorporação de ^3H -timidina radioativa e o ensaio colorimétrico do MTT foram utilizados para a análise do efeito citotóxico das substâncias hidrossolúveis liberadas pelos discos acrílicos em fibroblastos de rato (L929). O ensaio de incorporação de ^3H -timidina revelou que as substâncias liberadas das três resinas testadas foram mais citotóxicas às células L929 quando comparadas ao controle negativo. Entretanto, os eluatos de todos os materiais não apresentaram citotoxicidade frente ao teste do MTT. Ambos os ensaios de citotoxicidade demonstraram que os tratamentos térmicos não reduziram os efeitos citotóxicos das três resinas acrílicas aos fibroblastos de rato. Os autores concluíram que todos os materiais testados foram graduados pelo ensaio de incorporação da ^3H -timidina como levemente citotóxicos, mas não foram classificados como citotóxicos segundo o teste do MTT. A citotoxicidade das resinas termopolimerizáveis para base da prótese acrílica não foi reduzida pelos tratamentos térmicos propostos.

A citotoxicidade de monômeros, plastificante e subprodutos liberados por resinas acrílicas para reembasamento imediato foi avaliada por Chaves et al., em 2010. Os efeitos citotóxicos foram avaliados utilizando os métodos do MTT e da incorporação de ^3H -timidina radioativa após fibroblastos de ratos (L929) serem expostos por 24h a diferentes concentrações de um dos seguintes componentes: monômeros isobutil metacrilato (IBMA) e 1,6-hexanediol dimetacrilato (1,6 HDMA), plastificante dibutil-n-ftalato (DBNP) e subprodutos ácidos metacrilato (MA) e benzóico (BA). As concentrações de cada substância avaliada foram classificadas de acordo com a viabilidade celular em relação ao grupo controle: acima de 75% - não citotóxica; entre 25 e 50%, - discretamente citotóxica; abaixo de 25% - intensamente citotóxica. Os resultados mostraram que a síntese de DNA (ácido

desoxirribonucleico) foi inibida por todas as substâncias avaliadas. A atividade da desidrogenase mitocondrial foi reduzida nas células tratadas com monômeros, plastificante e subproduto MA, enquanto nenhum efeito citotóxico foi observado com o BA na maioria das concentrações testadas. Os autores sugeriram cautela ao extrapolar os resultados obtidos diretamente para aplicabilidade clínica, pois os efeitos de testes in vitro, diretamente realizados em células, são mais acentuados do que em condições bucais in vivo. Entretanto, os dados obtidos in vitro podem orientar os profissionais na escolha de um reembasador para base de prótese com componentes e subprodutos menos citotóxicos aos pacientes.

Em 2014, Chen, Wu e Cheng avaliaram, por meio do teste de difusão em ágar e ensaio de MTT, os efeitos citotóxicos de três adesivos para próteses removíveis. Para isso, três marcas comerciais de adesivos para próteses (Polident - creme, Protefix - creme e Protefix - pó) foram preparadas para contato indireto com queratinócitos orais humanos primários, fibroblastos orais humanos primários e fibroblastos de rato (L929). Quantidades apropriadas de cada marca de adesivo foram adicionadas a um meio de cultura fresco para obtenção de eluato a 1% (formulações de creme) ou 0,5% (formulação em pó). As misturas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ durante 24h. Os extratos foram utilizados para a determinação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT. A citotoxicidade foi classificada como severa para 30% ou menos de viabilidade celular, moderada para valores entre 30-59% e leve para porcentagens entre 60-90%. Valores de viabilidade celular de 90% ou mais foram considerados como não citotóxicos. Para o teste de difusão em ágar, anéis de teflon (10mm x 3mm) impregnados com os adesivos foram colocados em placas de agarose e incubados durante 24h a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Duas amostras de cada adesivo foram testadas juntamente com os controles positivo (anéis vazios de teflon) e negativo (discos de látex) em uma mesma placa. Após a incubação, as culturas foram examinadas em microscópio invertido antes e após a remoção das amostras. Os diâmetros das zonas de descoloração foram mensurados com uma régua milimetrada e a lise celular observada microscopicamente. Índices de zona de descoloração e de lise celular foram utilizados para determinação dos efeitos citotóxicos dos adesivos. Pelos dois ensaios de citotoxicidade, foi possível observar que os três adesivos testados foram classificados como leve a moderadamente citotóxicos às culturas de células humanas. Em contrapartida, foi observada

ausência de toxicidade às células de rato (L929) para todas as marcas comerciais de adesivos, sugerindo que as células primárias humanas da mucosa oral podem fornecer informações mais valiosas na determinação de citotoxicidade de adesivos para próteses removíveis.

O objetivo do trabalho de Lee et al., em 2015, foi comparar a citotoxicidade de quatro adesivos para base de próteses removíveis em fibroblastos gengivais humanos (HGF-1). Para isso, os fibroblastos foram cultivados a uma densidade de 1×10^5 cels/poço em placas de cultura de 24 poços incubadas por 24h. Então, placas de inserção contendo um dos adesivos testados (Polident, Protefix, Staydent ou Dentix-A), diluídos a uma concentração de 10%, foram inseridas nas placas de cultura e incubadas por 48h. Após esse período, o ensaio colorimétrico de MTT foi realizado, sendo as leituras de densidade ótica obtidas em espectrofotômetro a 500nm. Para o ensaio de apoptose por citometria de fluxo e a análise da morfologia celular por MEV, as células foram cultivadas a uma densidade de 4×10^5 cels/poço em placas de cultura de seis orifícios incubadas por 24h. Placas de inserção contendo um dos adesivos a 10% foram colocadas nas placas de cultura de seis orifícios para incubação por 48h. Todos os adesivos testados demonstraram significativamente menor viabilidade celular em relação às células controle propagadas em meio de cultura normal, sendo os piores resultados obtidos com o Staydent. Os adesivos Staydent e Protefix demonstraram significativamente maiores níveis de apoptose que o grupo controle, o qual não se diferiu estatisticamente dos adesivos Polident e Dentix-A. A análise em MEV evidenciou que todos os adesivos testados demonstraram densidades celulares relativamente mais baixas em comparação às células controle, que exibiram grandes extensões citoplasmáticas. As imagens de MEV revelaram poucos fibroblastos remanescentes para o adesivo Staydent. Os autores concluíram que os quatro adesivos para base de prótese resultaram em efeitos citotóxicos nos fibroblastos gengivais, sugerindo precaução na prescrição por parte dos clínicos em relação à quantidade e tempo de duração do uso desses produtos. Além disso, foi recomendado evitar o uso de adesivos contendo ingredientes a base de formaldeído como o Staydent.

A diferença de citotoxicidade de reembasadores resilientes para base de prótese dependendo de sua composição foi avaliada por Song et al., em 2014. Dez marcas comerciais de materiais resilientes disponíveis no mercado, sendo de cinco à base de silicone (Dentusil, GC Reline Mollosil plus, Mucopren e Sofreliner Tough) e

cinco à base de acrílico (Coe-Soft, Dura Base, Kooliner, Soft liner e Visco-gel) foram avaliadas por meio do ensaio colorimétrico de MTT e teste de sobreposição em ágar. Oito corpos de prova de cada marca comercial foram obtidos a partir de matrizes de teflon (5mm x 2mm), envelhecidos por 24h em água esterilizada e expostos à luz ultravioleta durante 30min para evitar contaminação. Os extratos foram obtidos dos corpos de prova com meio de cultura RPMI1640, sendo incubados durante 30min a 37°C em atmosfera umidificada 5% de CO₂. Meio de cultura sem amostras também foi preparado para servir como controle negativo. A avaliação da viabilidade celular foi obtida através do teste MTT e, para isso, 100µL de suspensão de fibroblastos de rato (L929) em RPMI1640 foram cultivados em placas de cultura de 96 poços, que foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂. Após 24h, o meio de cultura foi removido dos poços e alíquotas de 100µL de meio e 10µL de solução de MTT foram adicionadas em cada poço para incubação no escuro a 37°C por 4h. A absorbância gerada pela solução do MTT foi mensurada por um leitor de microplacas a 570nm. Para o teste de sobreposição em ágar, 5µL de suspensão de fibroblastos de rato (L929) foram semeadas em placas de cultura e incubadas a 37°C em 5% de CO₂. Após 24h de incubação, o meio de cultura foi repostado por meio ágar/nutriente contendo RPMI1640, 5% de soro fetal bovino e 3% de mistura de agarose. Uma alíquota de 5mL de solução vermelha neutra (0,01% em PBS) foi adicionada e as células incubadas por 15min em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido e os corpos de prova experimentais foram colocados sobre a superfície de ágar. Uma película de poliuretano de dibutilditiocarbamato de zinco a 0,25% de foi utilizada como controle positivo e uma folha de polietileno como controle negativo. As placas foram incubadas durante 24h a 37°C em 5% de CO₂ para o exame das culturas em microscópio de luz. As zonas de descoloração e a lise celular ao redor ou no interior dos corpos de prova foram avaliadas em acordo com a especificação 7405 da ISO. O teste do MTT mostrou que, entre os reembasadores à base de silicone, os materiais GC reline Soft, Mollosil plus e Dentusil não foram considerados citotóxicos em comparação com o controle. Mucopren e Sofreliner Tough foram classificados como ligeiramente citotóxicos, apresentando significativamente menor viabilidade celular que o controle. Entre os reembasadores à base de acrílico, os materiais Kooliner e Visco-gel foram considerados não citotóxicos e níveis leves de citotoxicidade foram encontrados para os materiais Soft liner, Dura Base e Coe-Soft. Entretanto, todos os materiais testados apresentaram

viabilidade celular superior ao limite de exigência da International Organization for Standardization (ISO 10993-5, 2009). No teste de sobreposição em ágar, todos os materiais à base de silicone e o reembasador acrílico Kooliner foram classificados como não citotóxicos. No entanto, entre os materiais acrílicos, o Visco-gel foi classificado como levemente citotóxico e os reembasadores Soft-Liner, Coe-Soft e Dura Base foram considerados moderadamente citotóxicos. De acordo com os resultados, os autores concluíram que os reembasadores resilientes à base de acrílico apresentam uma maior possibilidade de efeito citotóxico em relação àqueles de silicone.

2.4.2 DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

Hidalgo e Dominguez, em 2001, avaliaram os mecanismos subjacentes envolvidos na citotoxicidade induzida pela clorexidina em fibroblastos dérmicos humanos. Para isso, fibroblastos obtidos a partir de biópsias de pele foram cultivados até a confluência em frascos de 75cm² de área de cultura utilizando meio MEM (Minimum Essential Medium) suplementado com aminoácidos não essenciais, antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100mg/mL) e 10% de soro fetal de vitelo (FCS) para incubação a 37°C em 5% de CO₂. Microscopicamente, os fibroblastos apresentaram aparência e taxa de crescimento celular normal. Após a tripsinização, as células foram contadas utilizando um hemocítômetro e semeadas em placas de cultura de 96 poços (10³ cels/poço) para o período de aderência por 18h a 37°C. A solução de digluconato de clorexidina a 20% foi utilizada para preparar as diluições sucessivas em água, obtendo-se as concentrações finais que variaram entre 0,0005 a 0,25%. Água estéril foi utilizada para os controles. Os períodos de incubação foram de 3, 6, 8 e 24h, dependendo do ensaio utilizado para avaliar a citotoxicidade. Para avaliação da citotoxicidade, a determinação de ATP (Trifosfato de adenosina) intracelular foi realizada por um ensaio de bioluminescência com base na reação de luciferina-luciferase dependente de ATP. No final do ensaio, a luz emitida foi mensurada com um luminômetro e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de XTT. Antes do final dos períodos de exposição (3, 8 e 24h), a mistura reagente foi preparada e, após o período de incubação com clorexidina, os meios foram removidos e 150mL de meio MEM sem ou com FCS (2, 5 e 10%) foram adicionados aos poços, dependendo das condições

experimentais. Para cada poço, uma alíquota 50µL de mistura de reagente foi adicionada e incubada durante 4h a 37°C. As placas foram agitadas durante 1min e a absorbância foi medida a 450nm em um leitor de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A análise do conteúdo de ATP nos fibroblastos dérmicos humanos revelou que a clorexidina induziu uma diminuição estatisticamente significativa, o que foi dependente do tempo e da concentração. A clorexidina em concentrações acima de 0,02% produziu a perda total de ATP. No entanto, quando o ensaio metabólico XTT foi utilizado para determinar a viabilidade celular, os resultados mostraram que a exposição às concentrações de clorexidina inferiores a 0,005% permitiram sobrevivência celular nos períodos de 3 e 8h. Sob todas as condições experimentais, houve decréscimo na sobrevivência dos fibroblastos dérmicos humanos, que se acentuou progressivamente à medida que o período de exposição e as concentrações de clorexidina aumentaram. Pôde-se observar também que as incubações com clorexidina produziram uma supressão da síntese de DNA dependente da dose em todas as estirpes de fibroblastos dérmicos humanos examinados. Os autores concluíram, a partir dos resultados obtidos, que o digluconato de clorexidina, mesmo em concentrações muito inferiores às utilizadas na prática clínica (0,05% para queimaduras e feridas; 0,12% como enxaguantes bucais), apresentou efeitos adversos ao crescimento dos fibroblastos dérmicos humanos.

Tendo em vista a ampla utilização da clorexidina para o preparo tópico dos tecidos bucais e tratamento de doenças periodontais e peri-implantares, Giannelli et al., em 2008, avaliaram os efeitos desse antisséptico na viabilidade e morte celular de diferentes tipos de células (osteoblastos, células endoteliais e fibroblastos) que poderiam estar envolvidas nos procedimentos cirúrgicos orais. Os autores também investigaram os mecanismos ultraestrutural e molecular envolvendo o potencial citotóxico da clorexidina nas diversas células. As diferentes linhas celulares foram cultivadas a 37°C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ para, em seguida, serem tratadas com variadas concentrações de digluconato de clorexidina (0,0025%, 0,005%, 0,0075%, 0,01% e 0,12%) durante 1, 5 ou 15min. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTS [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio]. Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços (1,5 x 10⁴ cels/poço) e, após 48h de incubação, tratadas com clorexidina em fenol-vermelho por 1, 5 e 15min. As células foram

deslocadas em 100µL de meio fresco e, então, 20µL da solução do teste de MTS foram adicionados a cada poço. Após 4h de incubação, a densidade óptica de formazan solúvel foi mensurada por espectrofotômetro a 490nm. As médias foram obtidas a partir de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. As células também foram preparadas para avaliação em microscópio confocal de varredura a laser para mensurações de fluorescência. A apoptose celular foi avaliada por meio do ensaio ISEL (In Situ End Labelling) e alteração do potencial de membrana mitocondrial para células tratadas e não tratadas foi determinada pelo kit JC-1. A análise ultraestrutural das células foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a determinação do número de células mortas. Além disso, as células foram avaliadas quanto às concentrações intracelulares de cálcio por meio da análise confocal dos transientes de cálcio. A geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) foi determinada por substrato fluorogênico. O ensaio do MTS revelou que o tratamento das células com clorexidina afetou a viabilidade celular, o que foi dependente da dose e do tempo de exposição. Os osteoblastos mostraram-se altamente sensíveis ao tratamento, uma vez que tiveram sua viabilidade significativamente reduzida (57,5%) após a exposição à concentração de 0,01% de clorexidina durante 1min. As células endoteliais e os fibroblastos pareceram ser mais resistentes ao tratamento, demonstrando uma redução significativa da viabilidade celular (60-80%) após tratamento com concentrações mais elevadas de clorexidina (0,03-0,12%). Tratamentos mais prolongados (5min e 15min) induziram morte celular massiva em todos os tipos de células e para qualquer concentração do antisséptico. O efeito tóxico da clorexidina foi evidenciado em indução da morte celular apoptótica, autofágica e necrótica bem como nas alterações envolvidas na função mitocondrial e no cálcio intracelular. Os resultados obtidos reforçaram que o digluconato de clorexidina é citotóxico em diferentes tipos de células in vitro. A partir disso, os autores sugerem que a aplicação direta da clorexidina durante terapias regenerativas pode gerar efeitos tóxicos sobre os fibroblastos gengivais, células endoteliais e, em particular, sobre os osteoblastos alveolares, interferindo negativamente com a fase de cicatrização.

Arabaci et al., em 2013 avaliaram in vitro os efeitos citogenéticos e citotóxicos do digluconato de clorexidina em linfócitos humanos periféricos. Amostras de sangue de 10 doadores (cinco homens e cinco mulheres) saudáveis não fumantes foram coletadas. Os doadores tinham entre 20 e 24 anos de idade, sem nenhuma doença

detectada ou história de exposição a qualquer agente genotóxico. Os linfócitos do sangue periférico (0,5mL) foram cultivados em 5mL de meio de cultura (Meio B Cromossoma) com o seu teor normal (85mL de meio essencial mínimo, 15mL de soro fetal bovino, heparina 2500E, E 7500 penicilina, estreptomicina 5mg, 0,25mg de fito-hemaglutinina, ácido ascórbico 0,5mg e 0,5mg de glutatona). O digluconato de clorexidina em concentrações de 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,5mg/mL foi adicionado às culturas antes da incubação para análise. As culturas de linfócitos individuais sem clorexidina formaram um grupo de controle, enquanto que a mitomicina C (10^{-7} M) foi utilizada como controle positivo em todos os ensaios. O ensaio de micronúcleo (MN) foi utilizado para investigar a genotoxicidade, enquanto que a viabilidade e a proliferação das células foram avaliadas por teste de exclusão de azul de Tripán e índice de divisão nuclear, para as células do grupo controle e as tratadas com clorexidina em diferentes concentrações. A análise citogenética, obtida pelo teste de MN, foi realizada por meio da adição de citocalasina B após 44h de cultura. No final do período de incubação de 72h, os linfócitos foram fixados com metanol e ácido acético (1:1). As células fixadas foram colocadas diretamente em lâminas e coradas com Giemsa. Após a exposição à clorexidina, a viabilidade celular foi determinada por teste de exclusão de azul de Tripán e a porcentagem de células viáveis em 16 campos foi estipulada em câmara de Neubauer. Para a análise do ciclo celular, 400 células por grupo de tratamento foram pontuadas para a presença de um, dois ou mais de dois núcleos e, então, o índice de divisão nuclear (NDI) foi calculado. Um efeito tóxico dependente da dose de clorexidina foi encontrado sobre a viabilidade genética e celular dos linfócitos humanos. O ensaio de MN mostrou que a clorexidina a uma concentração de 0,5mg/mL obteve uma frequência de micronúcleos estatisticamente superior quando comparado aos grupos com doses mais baixas e ao controle. Não foram encontrados efeitos tóxicos sobre a viabilidade celular nas concentrações entre 0,05-0,2mg/mL de clorexidina. No entanto, o teste azul de Tripán mostrou 40% e 50% de redução na viabilidade das células para as concentrações de 0,4 e 0,5mg/mL, respectivamente. A morte celular nessas concentrações também foi significativamente mais elevada em comparação com aquelas mais baixas e o grupo controle. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que os efeitos genotóxicos e citotóxicos da clorexidina em linfócitos humanos se mostraram dose-dependentes.

2.4.3 HIPOCLORITO DE SÓDIO

O efeito citotóxico do hipoclorito de sódio em diversas concentrações foi avaliado por Pashley et al. (1985) por meio da utilização de três modelos biológicos independentes. Para realização da metodologia *in vitro*, sangue de voluntários foi recolhido em recipientes heparinizados e centrifugado a 1000g durante 10min. O plasma foi descartado e as células concentradas foram ressuspensas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS). Os glóbulos vermelhos foram escolhidos, pois a hemoglobina pode ser facilmente quantificada espectrofotometricamente. Cinquenta microlitros da suspensão de RBC foram adicionados a 10mL de solução salina isotônica, água destilada ou diferentes concentrações de hipoclorito de sódio em solução salina (1:100, 1:200, 1:400, e 1:1000). Após isso, foi deixado descansar a temperatura ambiente durante 30min. Os tubos foram então centrifugados durante 10min a 1000g. A porcentagem de hemólise foi determinada através da comparação da proteína total perdida de RBC colocado em água destilada com as células submetidas a outros tratamentos. Para os testes *in vivo*, oito coelhos saudáveis de ambos os sexos tiveram seus olhos fotografados e a espessura da córnea medida, antes de qualquer tratamento. Os valores iniciais também foram registrados para hiperemia conjuntival bulbar, índices de hiperemia conjuntival palpebral, edema conjuntival da pálpebra e secreção mucosa. As diluições de hipoclorito de sódio a 5,25% foram realizadas em água (para 1:10) ou soro fisiológico (para 1:100 e 1:1000) para se obter concentrações de NaClO a 5,25%, 0,525%, 0,052%, e 0,005%, respectivamente. Os coelhos receberam 0,05mL de NaClO no olho esquerdo e no olho direito foi pingado solução salina hipertônica (controle). Em seguida, fotografias e inspeção visual foram realizadas em 2, 6, 24, 48 e 72h e em 4 e 7 dias. Os testes *in vivo* ainda compreenderam injeções intradérmicas em 60 ratos de ambos os sexos. Todos os ratos foram anestesiados e receberam injeções de hipoclorito de sódio nas mesmas diluições supracitadas. Após 1h, 30 ratos foram eutanasiados e tiveram a zona da injeção removida cirurgicamente para a determinação da quantidade de plasma extravasado. Os outros 30 ratos foram devolvidos às suas gaiolas para as tomadas de fotografias diárias dos locais das injeções durante várias semanas, com objetivo de avaliar a resposta tecidual crônica. Os resultados *in vitro* mostraram que as diluições do hipoclorito de sódio abaixo de 1:1000 causaram completa hemólise. Os

coelhos que receberam hipoclorito de sódio a 5,25% em seus olhos esquerdos imediatamente reagiram lutando, sinalizando dor moderada. Essa reação não foi observada quando os olhos direitos dos coelhos foram avaliados (controle). Nenhuma das diluições mais baixas produziu qualquer outra manifestação de desconforto. Os olhos que receberam hipoclorito de sódio a 5,25% e 0,52% apresentaram edema palpebral de moderado a grave e hiperemia conjuntival dentro de 30min de exposição, atingindo o pico de gravidade após 2h. Diluições maiores de hipoclorito de sódio (1:100 e 1:1000) não tiveram efeitos sobre os olhos dos coelhos. Em geral, as injeções intradérmicas de hipoclorito de sódio a 5,25% produziram hemorragia imediata dentro de toda a área de contato da solução com o tecido dos animais. As concentrações mais baixas de hipoclorito de sódio produziram menor extravasamento de proteínas plasmáticas, mas mesmo assim esse evento foi cerca de quatro vezes maior do que o observado nos controles. Diluições mais elevadas de hipoclorito de sódio (1:10 e 1:100) não aumentaram o extravasamento de proteínas plasmáticas. Por fim, as injeções intradérmicas não diluídas ou as diluições de hipoclorito de sódio de 1:1, 1:2, e 1:4 produziram ulcerações na pele dos ratos. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio, embora seja um solvente proteolítico muito eficaz, é também extremamente citotóxico, devendo ser utilizado criteriosamente e com precaução na prática clínica.

Sagripanti e Bonifacino (2000) avaliaram a citotoxicidade de sete substâncias utilizadas na formulação de desinfetantes químicos e esterilizantes: hipoclorito de sódio a 4%, peróxido de hidrogénio a 30%, ácido peracético a 32%, glutaraldeído a 50%, formaldeído a 37%, fenol e uma mistura de ascorbato de cobre. Todos os agentes de desinfecção foram diluídos em solução salina tamponada com DPBS antes de cada teste. Para o teste de citotoxicidade, as monocamadas de células confluentes (L929, VERO, e células SC-1, de origem animal) foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em meio MEM a 5% (VERO) ou 10% (L929, SC-1) de FBS. As células foram contadas e semeadas em uma placa de cultura de 12 poços (2mL de suspensão por poço com $1,3 \times 10^5$ cels/mL). A placa foi incubada até que se verificasse a formação de uma monocamada confluenta. As células foram lavadas com DPBS e tratada com a solução desinfetante na concentração desejada durante 1h a 37°C sob 5% de CO₂. Após o tratamento das células com os desinfetantes líquidos, estes foram removidos e as células lavadas com DPBS para incubação por 24h em 2mL de MEM

suplementado com 10% de FBS. As monocamadas foram examinadas microscopicamente, sendo calculados o número relativo de células (RCN) e a viabilidade celular. Uma placa de 96 poços foi semeada com 2×10^4 cels/mL (L929) em 170 μ L de MEM suplementado com 5% de soro fetal de bovino para incubação durante 48h em atmosfera de CO₂. No dia do tratamento, o meio foi removido, as monocamadas foram lavadas com DPBS e 50 μ L de um dos desinfetantes ou DPBS foram adicionados a cada poço. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Para isso, as células foram incubadas durante 1h a 37°C. Após o tratamento com os desinfetantes, estes foram aspirados, as monocamadas foram lavadas com DPBS e 100 μ L de meio fresco foram adicionado a cada poço. As placas foram incubadas durante a noite em uma estufa de CO₂ a 37°C. Na manhã seguinte, uma solução de 5mg/mL de DPBS de MTT foi preparada. Imediatamente a seguir, adicionou-se 10 μ L da solução MTT a cada poço e a placa foi incubada a 37°C com CO₂ durante 4h. O meio foi então aspirado e descartado, 100 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço e a absorbância medida espectrofotométrica a 540nm. Uma alíquota das suspensões de células L929, preparadas por tratamento de monocamadas com tripsina, foi diluída em série, semeada e incubada durante 14 dias, período no qual as colônias de células estavam suficientemente nítidas para serem contadas visualmente. As colônias foram coradas com azul de Evans a 0,1% durante 10min e contadas. Suspensões de H9 ou CEM-SS (células humanas) foram centrifugadas e as células peletizadas foram ressuspensas em solução de Hanks, centrifugadas novamente e ressuspensas em DPBS. As células foram contadas e a suspensão ajustada em $1,3 \times 10^5$ cels/mL. Essa suspensão (0,5mL) foi tratada com 0,5mL de desinfetante durante 1h a 37°C em tubos de Eppendorf. Após o tratamento, as células foram centrifugadas e o sobrenadante, incluindo desinfetante, foi descartado. As células foram imediatamente lavadas mais uma vez com DPBS e ressuspensas em 1mL de meio novo. Após 24h de incubação, as células foram contadas e o RCN, a viabilidade e a sobrevivência foram determinados de forma idêntica como descrito para as células que cresceram em monocamadas. A toxicidade dos desinfetantes, observada no microscópio após o tratamento com concentrações relativamente elevadas para alguns agentes químicos (particularmente de glutaraldeído ou formaldeído), mostrou-se aparentemente baixa. A avaliação de toxicidade por exame microscópico direto foi considerada pelos autores um método insensível, podendo resultar em subestimação do risco que as

substâncias desinfetantes representam. De acordo com os resultados, os agentes líquidos de desinfecção podem ser classificados em três grupos principais de acordo com a sua toxicidade relativa: leve (fenol, peróxido de hidrogénio e formaldeído); moderada (hipoclorito de sódio) e severa (glutaraldeído, ascorbato cúprico, e ácido peracético). Os autores sugeriram que houve uma grande diferença no risco potencial entre os vários desinfetantes e esterilizantes testados.

Hidalgo, Bartolome e Dominguez, em 2002, investigaram os mecanismos de citotoxicidade e a eficácia bactericida do hipoclorito de sódio em fibroblastos dérmicos humanos. As concentrações de hipoclorito utilizadas variaram entre 0,00025 a 0,5%. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio de uma técnica de macrodiluição modificada, na qual diferentes concentrações de hipoclorito foram preparadas em tubos com BHI. Então, os diferentes micro-organismos foram adicionados a cada tubo com turvação ajustada para 0,5 na escala McFarland, utilizando um dispositivo fotométrico. As culturas, preparadas a partir das diferentes estirpes bacterianas (*S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, e *Streptococcus faecalis*), foram incubadas a 37°C durante 24h em condições aeróbicas, sendo posteriormente cultivadas em placas contendo ágar. Após mais 24h na incubadora, o crescimento bacteriano foi avaliado por contagem de colônias e a expressão dos resultados foi realizada de acordo com os seguintes critérios: inúmeras colônias (crescimento positivo), entre 1 e 25 colônias (crescimento) e ausência de colônias (crescimento negativo). Os controles positivos de crescimento foram obtidos com hipoclorito de sódio a 0,9%. Para o estudo de citotoxicidade, foram estabelecidas culturas de fibroblastos dérmicos humanos a partir de biópsias de pele. A suspensão de células foi contada em microscópio com uma câmara de Neubauer e semeada em placas de microtitulação de 96 poços a uma concentração de 10.000cels/poço. MEM com FCS a 2,5 ou 10% foi adicionado aos poços e as células foram deixadas aderir durante 18h a 37°C. Após esse tempo, 25µL de cada diluição de hipoclorito de sódio ou 25µL do desinfetante a 9% (para os controles) foram adicionados em concentrações graduadas. Todos os procedimentos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar. Para o ensaio de XTT, os meios foram removidos a partir das microplacas e, então, 100µL de MEM e 50µL de mistura de reagente XTT foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas durante 4h a 37°C e, ao final desse período, foram agitadas durante 1min para mensuração da absorbância a 450nm em um leitor de ELISA. A determinação de ATP intracelular

foi realizada por um ensaio de bioluminescência com base na reação de luciferina-luciferase dependente de ATP, onde a quantidade de luz emitida foi mensurada por um luminômetro automático de placas de microtitulação. Por fim, foi realizado um imunoensaio baseado na incorporação do análogo de pirimidina bromo-desoxiuridina (BrdU) no DNA das células em proliferação, utilizado para avaliar a síntese de DNA. Os resultados para o teste de atividade antimicrobiana revelaram três zonas bem diferenciadas: uma de inibição do crescimento total de todos os micro-organismos, produzida pelas concentrações de hipoclorito de sódio a 0,5%, uma zona intermediária de sensibilidade das bactérias ao hipoclorito de sódio em concentrações que variaram entre 0,25-0,025% e a terceira zona, correspondente a concentração de hipoclorito de sódio a 0,025%, que não produziu nenhum efeito sobre o crescimento bacteriano. Neste estudo, a espécie mais resistente à ação antisséptica do hipoclorito de sódio foi a *P. aeruginosa*. Em relação à ação citotóxica específica desse desinfetante em fibroblastos dérmicos humanos, o efeito mais precoce observado foi a depleção de ATP celular. Uma perda significativa de ATP celular foi observada já nas primeiras 3h de incubação para as diferentes concentrações testadas de hipoclorito de sódio. Uma perda de 45% de teor de ATP celular foi observada para essa solução na concentração de 0,0025%, atingindo 77% quando a concentração subiu para 0,005%. A diminuição no teor de ATP celular se mostrou dependente da dose. O principal efeito tóxico do hipoclorito de sódio sobre a viabilidade celular foi produzido em 8h de exposição, a partir da concentração de 0,0075%. No entanto, as células foram capazes de recuperar a viabilidade após 24h de incubação nessa solução em concentrações intermediárias e baixas (0,025-0,0075%). Quando a citotoxicidade foi avaliada por meio do efeito de hipoclorito de sódio sobre a síntese de DNA, uma inibição significativa e progressiva foi observada com concentrações de 0,0005%. Concentrações mais elevadas provocaram inibição total da síntese de DNA. A partir destes resultados, os autores concluíram que o hipoclorito de sódio pode apresentar efeitos citotóxicos em fibroblastos humanos in vitro em função da concentração e do tempo de exposição.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como proposta avaliar in vitro, a longo prazo, o potencial antimicrobiano residual e a citotoxicidade das soluções de digluconato de clorexidina e hipoclorito de sódio quando incorporadas a uma resina acrílica para base de prótese após sucessivos ciclos de imersão noturna diária.

A hipótese testada no presente estudo foi que a ação residual dos agentes de limpeza incorporados à resina acrílica resultará na inibição de dois patógenos associados à estomatite protética bem como em efeitos citotóxicos às células humanas gengivais.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVAS

Para a confecção dos corpos de prova foram utilizados moldes de silicone de condensação de consistência densa para uso laboratorial (Zetalabor – Zermack, Badia. Polesine, Rovigo, Itália) (Figura 1A e 1B), obtidos através de um padrão circular metálico de dimensões 10mm x 1mm (EBRAHIMI SARAVI; VOJDANI; BAHRANI, 2012; TAY et al., 2012). Os moldes de silicone foram preenchidos com cera 7 (Lysanda Produtos Odontológicos, São Paulo, SP, Brazil) e incluídos em muflas de latão polido n.6 (OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brazil) previamente isoladas com vaselina sólida (Figura 1C). As muflas foram preenchidas com gesso tipo III (Herodent, Vigodent S.A. Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) e então prensadas (Prensa Hidráulica Gold Line Essence Dental VH, Araraquara, SP, Brazil) a 0,5t por 1h (Figura 1D) para, então, serem abertas para a eliminação da cera com água quente. Após isso, os moldes de silicone foram preenchidos com resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550 (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil) (Figura 1E) e levados novamente a prensa hidráulica a 1,25t. Após 30min sob prensagem, a mufla foi posicionada em prensa manual (Figura 1F) e procedeu-se a polimerização da resina termopolimerizável em banho-maria (Banho Maria SL 155/22, Solab Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba, SP, Brazil) de acordo com o ciclo curto recomendado pelo fabricante (90min a 73°C e 30min a 100°C) (PAVARINA et al., 2005). Após o resfriamento, as amostras de resina acrílica foram desincluídas (Figura 1G) e tiveram seus excessos cuidadosamente removidos com uma broca de tungstênio cilíndrica do tipo maxcut (Dhpro, Rhadartrade, Paranguá, PR, Brazil) acoplada à peça de mão (Kavo do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Joinville, SC, Brazil) (Figura 1H). Então, as superfícies dos corpos de provas foram lixadas manualmente com lixa de carbeto de silício de granulação 180 (Figura 1I) até a obtenção de uma rugosidade superficial de $\pm 2\mu\text{m}$, aferida por um rugosímetro (Surftest SJ-301, Mitutoyo Corporation, Tokio, Japan). Esse procedimento foi

realizado com intuito de se criar uma rugosidade superficial semelhante à da superfície interna de uma prótese total (DA SILVA, P. M. et al., 2011).

FIGURA 1- Confeção dos corpos de prova: A- Silicone laboratorial (Zermack, Badia. Polesine, Rovigo, Itália); B- Moldes dos corpos de prova em silicone obtidos de padrões metálicos (10mm x 1mm); C- Inclusão dos moldes de silicone (preenchidos com cera) em mufla; D- Prensagem do gesso; E-Preenchimento dos moldes com a resina acrílica termopolimerizável; F- Mufla posicionada em prensa manual; G-Corpos de prova desincluídos; H- Remoção dos excessos; I-Lixamento das amostras para obtenção de rugosidade superficial ($\pm 2\mu\text{m}$).

Os corpos de prova finalizados foram imersos individualmente em 200mL de água destilada estéril para esterilização em micro-ondas por 3min a 650W (ALTIERI et al., 2013; ALTIERI et al., 2012; MIMA et al., 2008; PELLIZZARO et al., 2012). Antes de serem submetidas à imersão nos agentes químicos de limpeza, as

amostras estéreis foram armazenadas em água destilada estéril a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por $50\pm 2\text{h}$, de acordo com as especificações da International Organization for Standardization (ISO 1567, 1998). Um total de 186 corpos de prova foi produzido para o presente estudo.

4.2 CICLOS DIÁRIOS DE IMERSÃO

Com o intuito de simular situações clínicas, os corpos de prova foram individualmente imersos em uma placa de cultura de 24 poços (TPP®, Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland), contendo 2mL de umas das soluções de limpeza testadas (RODRIGUEZ ACOSTA et al., 2014): hipoclorito de sódio a 1%- NaClO (Farmácia Specifica Ltda, Bauru, SP, Brazil), digluconato de clorexidina a 2%- CLX (Farmácia Specifica Ltda, Bauru, SP, Brazil) e água destilada estéril (controle-H₂O) (Figura 2A e B). Os espécimes foram submetidos a três ciclos diários de desinfecção de 8h cada em uma das soluções pelo período de 91 dias (T91) ou 183 dias (T183) consecutivos, simulando, respectivamente, 9 meses ou 1,5 ano de imersão noturna diária realizada pelo paciente (PARANHOS et al., 2013; PISANI; DA SILVA; et al., 2012; PISANI; MACEDO; et al., 2012). As soluções foram substituídas uma vez ao dia durante os períodos experimentais (PISANI; MACEDO; et al., 2012).

FIGURA 2- Ciclos diários de imersão: A - Imersão individual dos corpos de prova em digluconato de clorexina a 2%; B- Imersão individual dos corpos de prova em hipoclorito de sódio a 1%.

4.3 ANÁLISE DO EFEITO RESIDUAL DOS AGENTES DESINFETANTES

Após o término dos períodos experimentais (T91 e T183), para conhecer o efeito residual antimicrobiano dos agentes de limpeza incorporados à resina acrílica, foi utilizado o método de concentração inibitória mínima (CIM) em meio líquido de cultura. Para esse primeiro experimento, 60 corpos de prova foram utilizados, sendo 20 para cada solução testada, dos quais 10 para cada período de imersão. Metade das amostras de cada período (n= 5) foi imersa nos meios específicos contendo o inóculo (1×10^7 cels/mL) (ALTIERI et al., 2013; ALTIERI et al., 2012; PELLIZZARO et al., 2012; SPIECHOWICZ et al., 1990) de um dos patógenos associados à estomatite protética: *C. albicans* e *S. aureus*.

4.3.1 PREPARO E PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS

Para o preparo do inóculo, as células dos micro-organismos (*C. albicans*- SC 5314 e *S. aureus*- ATCC 6538), mantidas a -70°C em solução contendo 20% de glicerol (CATALAN et al., 2008), foram semeadas em placas contendo meio de cultura específicos: ágar YEPD (Yeast Extract Peptone- Dextrose Agar, Clontech laboratories Inc, Mountain View, CA, USA) para *C. albicans* e ágar BHI (Brain Heart Infusion Agar, DIFCO TM, Becton Dickson Company, San Jose, USA) para *S. aureus*. As placas semeadas permaneceram incubadas a 37°C durante 48h em estufa bacteriológica (Mod. MA 033, Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP, Brazil) (ULUDAMAR; OZYESIL; OZKAN, 2011).

Após a incubação, uma colônia de *C. albicans* foi removida da placa, ressuspensa em 50mL de caldo YEPD (Yeast Extract Peptone- Dextrose Broth, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) e mantida *overnight* (aproximadamente 16h) em incubadora com agitação orbital (Shaker- Mod. 430/RDBP, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brazil) a 30°C, sob agitação de 180rpm, resultando em uma pré-cultura (EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL; INFECTIOUS, 2000; RAMAGE et al., 2001). Uma alíquota de 5mL foi retirada da cultura e colocada em

tubos Falcon de 15mL (TPP 91015, Techno Plastic Prod, Trasadingen, SH, Switzerland), que foram submetidos à centrifugação (Centrífuga mod. 5804 R, Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil) a 4000rpm por 5min, sendo o sobrenadante resultante do processo desprezado. A purificação das células foi realizada por meio de lavagem do pellet com 5mL de PBS (Phosphate Buffer Solution; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) e homogeneização em vórtex (Agitador de Tubos Tipo Vortex Mod. QL-901 Biomixer, Curitiba, PR, Brazil), seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, com descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido por duas vezes (RAMAGE et al., 2001). O pellet final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuspensionado em 1mL de PBS e diluído a uma concentração de 1:10000. Uma alíquota da diluição foi colocada em câmara de Neubauer para contagem das leveduras em microscópio óptico (Bausch & Lomb South Africa Pty. Ltd., Gauteng, South Africa) (BIZERRA et al., 2008) (Figura 3A e B). Conhecida a concentração final da suspensão, esta foi diluída em PBS para obtenção do inóculo de *C. albicans* em uma concentração de 1×10^7 cels/mL (CHANDRA et al., 2001; PAVAN et al., 2010)

FIGURA 3- Preparo do inóculo de *C. albicans*: A- Alíquota da diluição em câmara de Neubauer; B- Contagem das leveduras em microscópio óptico.

Uma única colônia de *S. aureus* foi removida e ressuspensionada em 50mL de caldo BHI para incubação a 37°C *overnight* (EUCAST, 2000). A suspensão obtida foi centrifugada e o sobrenadante descartado e substituído por tampão fosfato pH 7,0. A concentração do inóculo foi padronizada, comparando a turbidez do inóculo com o padrão 0,5 da escala de MacFarland em espectrofotômetro (Synergy Mx

Monochromator Based Biotek® Winooski, Vermont, USA) a 600nm (ALTIERI et al., 2013; SPIECHOWICZ et al., 1990). Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a $1,5 \times 10^8$ cels/mL. O inóculo de *S. aureus* foi então ajustado para 1×10^7 cels/mL (ALTIERI et al., 2012; ALTIERI et al., 2013).

4.3.2 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS AGENTES DE LIMPEZA INCORPORADOS A RESINA ACRÍLICA

A fim de saber o possível efeito residual dos agentes de limpeza que ficaram incorporados à resina acrílica após os períodos experimentais, os corpos de prova foram transferidos individualmente para poços de uma placa de cultura de 24 poços. Em seguida, foram adicionados em cada poço 2mL de caldo de TSB (Tryptic Soy Broth, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, USA) para *C. albicans* ou 2mL de caldo de BHI para *S. aureus*. Cada corpo de prova no interior dos poços com os meios de cultura foi então inoculado com 5µL da suspensão bacteriana ou fúngica (1×10^7 cels/mL) (Figura 4A). Poços contendo somente o inóculo fúngico/bacteriano (1×10^7 cels/mL) ou apenas os meios de cultura foram utilizados como controles microbianos positivos e negativos, respectivamente. (JORGENSEN; TURNIDGE; WASHINGTON, 1999).

A viabilidade dos micro-organismos foi observada pela turbidez determinada em níveis de absorbância por um espectrofotômetro programado com comprimento de onda de 600nm (ALTIERI et al., 2013; SPIECHOWICZ et al., 1990) (Figura 4B). As leituras em espectrofotômetro foram realizadas nas placas de cultura de 24 poços contendo os corpos de prova nos seguintes períodos após a inoculação dos micro-organismos: inicial (imediatamente após a inoculação), 24h, 7 e 14 dias.

FIGURA 4: Análise do efeito residual dos agentes desinfetantes: A- Corpos de prova de cada solução testada contendo os inóculos microbianos para incubação a 37°C; B- Determinação dos valores de absorbância em espectrofotômetro.

A análise da CIM nos diferentes períodos foi realizada calculando-se o percentual de viabilidade dos micro-organismos a partir das densidades ópticas (DO) obtidas nos poços contendo corpos de prova comparando com aquelas do controle microbiano positivo (100% de viabilidade). Após isso, os percentuais de morte celular foram calculados por meio da subtração dos percentuais de viabilidade dos extratos de 100%.

A determinação das porcentagens de redução foi obtida por meio das leituras espectrofotométricas dos grupos que possuíam efeitos residuais dos agentes químicos de limpeza (experimentais) em relação ao grupo controle (sem inibição do crescimento microbiano), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{(\text{Abs } 600\text{nm}) \text{ controle} - (\text{Abs } 600\text{nm}) \text{ experimental}}{(\text{Abs } 600\text{nm}) \text{ controle}} \times 100$$

4.4 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE

As amostras destinadas à análise de citotoxicidade foram previamente enxaguadas em água destilada estéril de forma asséptica em câmara de fluxo laminar (Pachane Indústria e Comércio Ltda., Piracicaba, SP, Brazil), com o objetivo

de eliminar os possíveis excessos das soluções de limpeza (CAMPANHA et al., 2012; PARANHOS et al., 2013).

4.4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A análise do efeito citotóxico dos agentes químicos incorporados e liberados pelos corpos de prova foi realizada pelo ensaio colorimétrico do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio]. Para isso, os extratos das amostras foram obtidos em acordo com as normas da ISO 10993-5, de 2009. Três corpos de prova de cada agente de limpeza (CLX, NaClO e H₂O) para cada período experimental (T91 e T183) foram colocados dentro de tubos de ensaio com 3mL de meio de cultura Eagle (Meio de cultura Eagle, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), suplementado com 7,5% de soro fetal bovino (Soro fetal bovino, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) e 80µg/mL de gentamicina (Sulfato de gentamicina, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Os tubos foram incubados a 37°C por 24h para as substâncias possivelmente tóxicas serem difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos que foram utilizados nos testes de citotoxicidade. Um tubo de ensaio contendo apenas 3mL de meio de cultura com as células foi armazenado sob as mesmas condições, servindo como controle negativo. Além disso, três corpos de prova de resina acrílica, logo após a confecção e sem armazenamento nos agentes de limpeza, também foram colocados dentro de tubos de ensaio com 3mL de meio de cultura Eagle (preparado da mesma forma como descrito previamente) para serem incubados a 37°C por 24h.

4.4.2 CULTURA E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS

O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelas resinas foi avaliado pelo método de cultura de células, utilizando fibroblastos gengivais humanos (L929), previamente obtidos a partir de culturas oriundas de um retalho de cirurgia periodontal realizada na Faculdade de Odontologia de Bauru –USP, o qual

foi doado pelo paciente sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da FOB/USP (CAAE: 39465514.9.0000.5417) (Anexo A).

As células foram propagadas em meio de cultura de Eagle suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80µg/mL de gentamicina. O cultivo das células foi realizado em frascos (Frascos para cultura de células, Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO₂. Esses frascos foram incubados a 37°C em estufa para cultura de células (Estufa bacteriológica, Fanem[®], São Paulo, SP, Brazil) com 5% de CO₂ e ambiente com umidade controlada.

É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em área asséptica da chama do bico de Bunsen dentro da capela de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool 70%. Além disso, os materiais utilizados, com exceção das células, foram esterilizados previamente em luz ultravioleta durante 20min dentro da capela de fluxo laminar.

4.4.3 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS

Para o preparo da concentração de 1×10^5 cels/mL, as células foram descoladas do fundo dos frascos por meio de um raspador de células (Raspadores de células, Costar, Corning Incorporated, Corning, New York, NY, USA). Em seguida, cada suspensão obtida foi colocada em um tubo de 15mL (TPP 91015, Techno Plastic Prod, Trasadingen, SH, Switzerland) e levada para uma centrífuga especial autobalanceável (Centrífuga mod. 5804 R, Eppendorf do Brazil Ltda., São Paulo, SP, Brazil) por 5min a 1.500rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1mL de meio de cultura Eagle, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80µg/mL de gentamicina, foi acrescentado e as células misturadas ao mesmo. Dessa mistura, 10µL foram retirados e adicionados a 90µL de corante azul de Tripan (Corante azul de Tripan, Merck - Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). De tal solução, 10µL foram removidos e introduzidos na câmara de Neubauer (Câmara hemocitométrica tipo Neubauer, Boeco, Hamburg, Germany), onde as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (Nikon YS 100, Tokyo, Japan) com aumento de

40x. Então, a suspensão foi ajustada a uma concentração de 1×10^5 cels/mL de meio de cultura.

Para análise da citotoxicidade, o ensaio colorimétrico MTT, baseado na redução celular de MTT foi utilizado. Por esta técnica o sal metiltetrazolium é incorporado à cultura de células. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal tetrazolium, produzindo cristais de formazan cor azul, determinando, dessa forma, valores relativos à intensidade da cor azul em espectrofotômetro (Synergy Mx Monochromator Based Biotek® Winooski, Vermont, USA) com comprimento de onda determinado. Quanto maior a atividade mitocondrial, maior a intensidade da luz azul e, assim, maior o número de células viáveis. Para a realização do teste, 100µL da suspensão composta de 1×10^5 cels/mL, ou seja, 1×10^4 cels/mL, foram colocados em cada compartimento de uma placa de cultura de 96 poços, (TPP®, Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland), incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24h. Após a incubação, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa. Então, 50µL de meio de cultura novo foram colocados em cada orifício da placa juntamente com 50µL do extrato contendo as substâncias liberadas pelos corpos de prova. Em seguida, as placas foram incubadas por 24h em estufa com 5% de CO₂, a temperatura de 37°C. Para cada condição experimental (solução x tempo), foram destinados três compartimentos da placa de cultura. Outros três orifícios da placa não receberam o extrato das substâncias liberadas, mas sim apenas 100µL de meio de cultura novo suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80µg/mL de gentamicina (controle negativo). Após o período de incubação de 24h, 10µL de sal metiltetrazolium (5mg/mL, MTT-brometo tiazolil azul de tetrazólio, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) foi adicionado a cada orifício da placa, a qual permaneceu incubada por um período de 3 a 4h a 37°C para a formação dos cristais de formazan, decorrentes da atividade mitocondrial. Em seguida, 100µL de solução solubilizadora de MTT (DMSO) foram adicionados a cada orifício da placa de cultura, que foi agitada levemente visando a dissolução dos cristais de formazan. Em seguida, a análise da atividade mitocondrial foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 500nm (LEE et al., 2015) (Figura 6A e B).

É importante ressaltar que os procedimentos com MTT foram realizados em triplicatas dentro de seis experimentos diferentes para uma maior confiabilidade e precisão dos resultados obtidos.

FIGURA 5: Análise da citotoxicidade; A- Placa de cultura de 96 poços contendo os extratos; B- Análise da atividade mitocondrial pelo método do MTT em espectrofotômetro.

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental do presente estudo envolveu duas análises de resultados: inibição de crescimento dos patógenos e viabilidade celular (%).

Os dados de inibição de crescimento foram obtidos a partir da análise do meio de cultura em caldo, durante diferentes períodos de incubação (24h, 7 e 14 dias), em contato com os discos de resina acrílica termopolimerizável para base de prótese submetidos a 3 ciclos diários de imersões em dois agentes de limpeza (NaClO e CLX) ou água destilada (H₂O-controle) por 91 ou 183 dias. Foram confeccionados 60 corpos de prova para essa metodologia, sendo 20 para cada solução testada, dos quais 10 para cada período de imersão e 5 para cada patógeno (*C. albicans* e *S. aureus*).

O teste de citotoxicidade foi realizado nos corpos de prova de resina acrílica imersos em três diferentes soluções (H₂O, NaClO e CLX) em função de dois diferentes tempos (T91 e T183) de imersão. Corpos de prova não imersos foram selecionados como controle positivo e meio de cultura sem corpos de prova (apenas com células) como controle negativo. Para cada condição experimental, foram utilizados três corpos de prova, perfazendo um volume amostral de 21 espécimes. Como foram realizados seis experimentos para a análise de citotoxicidade, um total de 126 corpos de prova foi produzido para essa metodologia.

Os resultados de viabilidade celular foram analisados quantitativamente por análise estatística (ANOVA 1-fator seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey HSD). Da

mesma forma, análises do poder da amostra foram realizadas para os dados obtidos (IBM SPSS 18; SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA). Adotou-se um intervalo de confiança de 95% ($\alpha=0,05$).

Com base na atividade relativa aos valores obtidos para o controle negativo, o efeito residual dos agentes químicos de limpeza foi classificado de acordo com a citotoxicidade em: não-citotóxico (viabilidade celular acima de 75% em relação ao controle negativo), discretamente citotóxico (viabilidade celular entre 50 e 75% em relação ao controle negativo), moderadamente citotóxico (viabilidade celular entre 25 e 50% em relação ao controle negativo) e intensamente citotóxico (viabilidade celular abaixo de 25% em relação ao controle negativo) (ISO 10993-5, 2009; JORGE et al., 2004; TANG et al., 1999).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICROBIANO

As médias das porcentagens de inibição do crescimento de *C. albicans* e *S. aureus* para as soluções de hipoclorito de sódio a 1% e digluconato de clorexidina a 2% que ficaram incorporadas à resina acrílica nos diferentes períodos de incubação encontram-se na Tabela 1. Como não foi observada inibição de crescimento microbiano no grupo controle (imersão em água destilada), esses resultados não foram descritos na tabela.

Tabela 1- Médias das porcentagens de inibição do crescimento de *C. albicans* e *S. aureus* para os agentes de limpeza incorporados à resina acrílica nos períodos de incubação testados.

Soluções/tempo	Patógeno	Período de avaliação		
		24h	7d	14d
NaClO T91	<i>C. albicans</i>	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	0	0	2,70%
NaClO T183	<i>C. albicans</i>	0	0	8,50%
	<i>S. aureus</i>	0	0	15,08%
CLX T91	<i>C. albicans</i>	19%	51,93%	62,41%
	<i>S. aureus</i>	0	35,50%	37,60%
CLX T183	<i>C. albicans</i>	33,82%	61,26%	73,58%
	<i>S. aureus</i>	68,88%	79,90%	87,08%

Pela Tabela 1 é possível observar que o hipoclorito de sódio a 1% em 91 dias de imersão não resultou em inibição de *C. albicans* e *S. aureus* ao longo dos períodos de incubação, exceto por uma discreta inibição bacteriana em 14 dias. No

período de 183 dias em hipoclorito de sódio, não houve inibição microbiana em até 7 dias de incubação, sendo apenas observada uma discreta inibição fúngica e bacteriana em 14 dias (Tabela 1).

O digluconato de clorexidina a 2% em 91 dias de imersão promoveu uma inibição de *C. albicans* progressiva ao longo dos 14 dias de incubação (Tabela 1). Para o mesmo tempo de imersão (T91), não foi observada inibição de *S. aureus* em 24h, havendo em 7 e 14 dias de incubação uma redução percentual semelhante para o crescimento bacteriano. Os resultados da Tabela 1 também evidenciam inibição percentual progressiva tanto para *C. albicans* quanto para *S. aureus* ao longo do 14 dias de incubação, sendo o efeito antibacteriano maior que o antifúngico em todos os períodos.

5.2 VIABILIDADE CELULAR

Para o número de corpos de prova utilizado para a avaliação da citotoxicidade (n=6), este estudo apresentou poder adequado de 100% ($\alpha=0,05$).

As médias dos valores originais de cada experimento, médias gerais e desvio-padrão das densidades óticas a 500nm determinadas pelo ensaio do MTT para as condições testadas neste estudo estão descritas na Tabela 2.

Inicialmente, um modelo de regressão múltipla foi aplicado para avaliar a normalidade de distribuição dos dados de viabilidade celular, utilizando o software SAS 8.0 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, EUA). Os dados apresentaram uma distribuição normal e, assim, a análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) de fator único ("grupo"). É importante ressaltar que apenas um fator de variação ("grupo") foi considerado, pois as amostras não eram vinculadas em função do tempo, uma vez que foram produzidas e utilizadas de forma independente. Assim, foram avaliadas oito diferentes condições de estudo (grupos): controle negativo (apenas células sem amostras), resina acrílica (amostras sem imersão nas soluções), H₂O-T91 (amostras imersas em água destilada por 91 dias), H₂O-T183 (amostras imersas em água destilada por 183 dias), NaClO-T91 (amostras imersas em hipoclorito de sódio por 91 dias), NaClO-T183 (amostras

imersas em hipoclorito de sódio por 183 dias), CLX-T91 (amostras imersas em clorexidina por 91 dias), CLX-T183 (amostras imersas em clorexidina por 183 dias).

Tabela 2: Médias dos valores originais de cada experimento, médias gerais e desvios-padrão das densidades óticas (DO) obtidas nas diferentes condições experimentais.

Experimento	Controle negativo	Resina Acrílica	H ₂ O T91	NaClO T91	CLX T91	H ₂ O T183	NaClO T183	CLX T183
1	0,58	0,21	0,22	0,36	0,09	0,24	0,26	0,08
2	0,54	0,35	0,38	0,40	0,16	0,37	0,35	0,17
3	0,86	0,54	0,44	0,49	0,11	0,44	0,62	0,16
4	0,70	0,40	0,37	0,56	0,13	0,39	0,49	0,26
5	0,57	0,37	0,40	0,34	0,09	0,42	0,40	0,12
6	0,65	0,40	0,32	0,31	0,08	0,58	0,32	0,14
Média	0,65	0,38	0,36	0,41	0,11	0,41	0,41	0,16
D.V.	0,12	0,11	0,08	0,10	0,03	0,11	0,13	0,06

O sumário da ANOVA-1 fator para a viabilidade celular está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Análise de variância de 1 fator para os dados de viabilidade celular.

Efeito	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F	P
Entre grupos	1,175	7	0,168	18,115	0,000
Inter grupos	0,371	40	0,009		
Total	1,546	47			

Os resultados da análise de variância demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p=0,000$).

Uma vez que os resultados da ANOVA demonstraram significância para os grupos estudados, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey HSD. Na Figura 7 estão expostos os valores percentuais médios e os desvios-padrão da viabilidade celular (%) e a significância estatística para as condições de estudo.

FIGURA 7: Sobrevivência celular (teste do MTT) às soluções de limpeza incorporadas na resina acrílica pelos períodos T91 e T183. Resultados expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Os resultados demonstraram que o controle negativo (células sem amostras) apresentou significativamente os maiores valores de viabilidade celular ($p < 0,002$) entre todas as condições experimentais. As amostras submetidas à imersão em água ou hipoclorito de sódio durante 91 ou 183 dias apresentaram valores de viabilidade celular sem diferença significativa daquelas de resina acrílica não imersas em qualquer tipo de solução ($p > 0,05$). Os menores resultados de viabilidade celular foram encontrados nas amostras imersas em clorexidina para ambos os períodos avaliados no estudo ($p < 0,018$).

Considerando os percentuais de viabilidade celular, foi possível constatar que a clorexidina incorporada à resina acrílica para base de próteses removíveis apresentou níveis abaixo de 25% em relação ao controle para ambos os períodos de imersão simulados (T91 = 16,9% e T182 = 24,61%), sendo seu efeito considerado intensamente citotóxico sobre os fibroblastos gengivais humanos. Para a resina

acrílica sem imersão, a água destilada e o hipoclorito de sódio em ambos os períodos de imersão testados, foi observado discreto efeito citotóxico sobre as células (níveis de viabilidade celular entre 50 e 75% em relação ao controle), com médias percentuais semelhantes entre si: Resina acrílica= 58,46%; H₂O-T91 = 55,38%; H₂O-T183 = 63,07%; NaClO-T91= 63,07%; NaClO-T183 = 63,07%.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A estomatite protética está primariamente associada à infecção por *Candida* spp., (ARENDORF; WALKER, 1987; BAENA-MONROY et al., 2005; BANTING; HILL, 2001; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; PIRES et al., 2002; RITCHIE et al., 1969; SALERNO et al., 2011; ZOMORODIAN et al., 2011), sendo a *C. albicans* a espécie mais prevalente, identificada em 50 a 98% dos casos (BAENA-MONROY et al., 2005; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; MIMA et al., 2012; PIRES et al., 2002; SANITA et al., 2011; SILVA et al., 2012). Outras espécies frequentes de *Candida*, menos prevalentes que a *C. albicans* incluem *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Tais espécies, contudo, não têm sido associadas a uma prevalência aumentada ou importância patológica na estomatite protética (GENDREAU; LOEWY, 2011). O papel da *C. albicans* na estomatite protética também foi reforçado com o estudo de Campos et al. (2008) que demonstrou que apesar de 82 filotipos de bactérias serem identificados em biofilmes protéticos, tal espécie foi a única do tipo fungo isolada das próteses dos pacientes com essa patologia. As bactérias do biofilme protético, sobretudo os cocos, favorecem a adesão das células fúngicas às superfícies internas das próteses por coagregação, resultando em aumento da virulência da microflora por interação sinérgica, o que facilita a invasão tecidual por *Candida* (SATO et al., 1997). Os resultados obtidos pelo estudo de Baena-Monroy et al. (2005) demonstraram a associação entre bactéria e fungo, principalmente *S. aureus* e *C. albicans* na colonização da mucosa bucal e superfície interna das próteses de pacientes com estomatite protética. Os autores concluíram que a conduta diante dessa patologia se torna complicada frente à sua etiologia multifatorial e cofatores associados. Considerando esses aspectos, o presente estudo selecionou os micro-organismos *C. albicans* e *S. aureus* para a avaliação da ação antimicrobiana residual dos agentes químicos para limpeza de próteses.

A superfície interna das próteses removíveis representa uma fonte potencial de infecção e reinfecção aos tecidos moles bucais do paciente pela *Candida* spp., favorecendo o desenvolvimento da estomatite protética (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; MIMA et al., 2012). Para prevenir a formação do biofilme na

superfícies acrílicas e auxiliar no tratamento dessa patologia, tem sido recomendada a limpeza mecânica associada à desinfecção química das próteses. (DILLIS et al., 1988; WEBB et al., 1998). A natureza multiespécie dos biofilmes relacionados à estomatite protética exige que as soluções químicas de limpeza sejam eficazes em reduzir tanto a presença de fungos quanto a de bactérias (DILLIS et al., 1988). Dentre os agentes mais utilizados para a desinfecção química das próteses, o hipoclorito de sódio e o digluconato de clorexidina destacam-se por sua eficiência na redução do biofilme protético e prevenção da estomatite protética (BANTING; HILL, 2001; BARNABE et al., 2004; CHAU et al., 1995; DE ANDRADE et al., 2012; PELLIZZARO et al., 2012; ROSSATO et al., 2011; WEBB et al., 2005). No presente estudo, foi investigado se tais soluções químicas, quando incorporadas à resina acrílica para base de prótese após longos períodos de imersão diária, seriam eficientes na inibição de dois patógenos comumente associados à estomatite protética (*C. albicans* e *S. aureus*).

Para conhecer o efeito antimicrobiano residual dos agentes químicos de limpeza, os corpos de prova da presente pesquisa foram imersos nessas soluções em três ciclos diários de 8h por 183 dias consecutivos. Esse esquema de imersão visou simular o período de 1,5 ano de exposição das próteses removíveis aos agentes de limpeza seguindo um regime de imersão diária durante a noite (8h/dia), como é rotineiramente recomendado aos pacientes (PISANI; DA SILVA; et al., 2012; PISANI et al., 2010; PISANI; MACEDO; et al., 2012). A análise do efeito residual e citotoxicidade das soluções químicas de limpeza incorporadas à resina acrílica da base protética após longo período de uso (até 1,5 ano) é importante, pois os pacientes dificilmente substituem suas próteses antes deste tempo (PARANHOS et al., 2013; PISANI; DA SILVA; et al., 2012; PISANI et al., 2010; PISANI; MACEDO; et al., 2012).

Como as próteses removíveis são submetidas a inúmeros processos de desinfecção nos agentes químicos ao longo de sua vida útil, alguns estudos têm sido realizados para avaliar as consequências de repetidos ciclos de imersão noturna sobre as propriedades dos materiais para base de prótese (PARANHOS et al., 2013; PISANI; DA SILVA; et al., 2012; PISANI et al., 2010; PISANI; MACEDO; et al., 2012). Por outro lado, falta informação sobre a ação antimicrobiana residual a longo prazo das soluções de limpeza que ficam incorporadas aos materiais para base de prótese bem como de seus possíveis efeitos citotóxicos às células bucais.

Têm sido demonstrado efeitos genotóxicos e citotóxicos significativos decorrentes da utilização do hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina em suas diferentes formas de aplicações clínicas para uma variedade de tipos de células (ALKAHTANI et al., 2014; ARABACI et al., 2013; CHANDRASEKHAR et al., 2013; GHABANCHI et al., 2013; GIANNELLI et al., 2008; HIDALGO et al., 2002; HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001; IZ et al., 2013; LI et al., 2014; MIRHADI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2004; SAGRIPANTI; BONIFACINO, 2000; SHETTY et al., 2014). Apesar disso, a toxicidade aos tecidos bucais do resíduo das soluções que ficam incorporadas à resina acrílica para base de prótese não foi avaliada até o momento na literatura disponível. Isso é relevante clinicamente uma vez que os agentes químicos não entram em contato direto com os tecidos bucais dos usuários de prótese removíveis, já que estas são normalmente enxaguadas após a imersão noturna diária.

Tendo em vista as considerações anteriores, o presente estudo se propôs a avaliar *in vitro*, em um primeiro experimento, se soluções de digluconato de clorexidina a 2% e hipoclorito de sódio a 1% possuiriam efeito antimicrobiano residual, ou seja, se o que ficava incorporado à resina acrílica para base de prótese resultaria em inibição de dois patógenos comumente associados à estomatite protética. Confirmada a ação antimicrobiana residual a longo prazo destas soluções nesta investigação, foi realizado um segundo experimento para avaliar se os agentes incorporados à resina acrílica causariam efeitos citotóxicos às células humanas dos usuários de próteses removíveis. Pelos resultados obtidos, foi aceita a hipótese testada, ou seja, os agentes de limpeza incorporados à resina acrílica resultaram em algum grau de efeito antimicrobiano residual e citotoxicidade às células humanas.

Os resultados deste estudo mostraram que o efeito antimicrobiano residual permaneceu efetivo apenas para as amostras imersas em digluconato de clorexidina a 2%, resultando em inibição progressiva de crescimento de *C. albicans* e *S. aureus* ao longo dos 14 dias de incubação em ambos os períodos de imersão testados (T91 e T183). O mesmo resultado não foi observado com hipoclorito de sódio a 1%, uma vez que essa solução incorporada aos corpos de prova submetidos aos repetidos ciclos de imersão (T91 e T183) não promoveu ação antimicrobiana ao longo dos períodos de incubação, exceto por uma pequena inibição fúngica e bacteriana em 14 dias. Como não há informação sobre a ação antimicrobiana a longo prazo de

imersões noturnas sucessivas aos agentes de limpeza para próteses, as comparações com os resultados obtidos neste estudo puderam ser realizadas apenas com avaliações que utilizaram curtos períodos de imersão. Altieri et al. (2012) e Pellizzaro et al. (2012) encontraram maior efetividade da solução de digluconato de clorexidina a 2% em relação ao hipoclorito de sódio a 1% sobre, respectivamente, biofilme de *S. aureus* resistente a metilicina e de *C. albicans*, após ciclo único de desinfecção nestas soluções. Por outro lado, Montagner et al. (2009) encontraram maior ação inibitória de *C. albicans* em amostras de resina acrílica para as soluções a base de hipoclorito de sódio em relação à de digluconato de clorexidina a 2% para 10min de imersão.

O poder de incorporação da clorexidina à resina acrílica e seu consequente efeito antimicrobiano residual prolongado observados nos presentes resultados podem ser explicados por dois fatores: a maior concentração em relação ao hipoclorito de sódio nesta investigação e sua propriedade bioquímica de substantividade. A seleção das duas soluções de limpeza testadas nesta pesquisa foi realizada com base em estudos prévios que indicaram o uso do hipoclorito de sódio a 1% (PISANI; DA SILVA; et al., 2012; PISANI et al., 2010; PISANI; MACEDO; et al., 2012) e digluconato de clorexidina a 2% (BUDTZ-JORGENSEN, 1990; DE ANDRADE et al., 2012; ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2000; LAL et al., 1992) como agentes químicos de imersão para próteses removíveis durante o período noturno. Além disso, tais soluções nas concentrações selecionadas foram utilizadas em outros estudos para inibição de *C. albicans* (BUERGERS et al., 2008; DE ANDRADE et al., 2012; PAVARINA et al., 2003; PELLIZZARO et al., 2012) e *S. aureus* (ALTIERI et al., 2013). Apesar de não ter sido observado um efeito antimicrobiano efetivo do hipoclorito de sódio a 1% incorporado à resina acrílica no primeiro experimento, sua citotoxicidade foi testada no segundo experimento da presente pesquisa por não haver estudos prévios na literatura disponível que utilizaram ou recomendaram imersão noturna das próteses nessa solução em concentrações superiores a 1%. As avaliações a longo prazo do efeito de imersões noturnas repetidas em hipoclorito de sódio sobre propriedades dos materiais para base de próteses e tratamento da estomatite protética tem utilizado tal agente químico em concentrações de 0,02% (WEBB et al., 2005), 0,5% (HONG et al., 2009; PARANHOS et al., 2013; WEBB et al., 2005) e 1% (DAVI et al., 2010; PISANI; DA SILVA; et al., 2012; PISANI et al., 2010; PISANI; MACEDO; et al., 2012). Estudos

prévios observaram que algumas células de *C. albicans* e *S. aureus* permanecem em superfícies acrílicas após diferentes períodos de imersão em hipoclorito de sódio a 1% (DA SILVA, F. C. et al., 2008; PELLIZZARO et al., 2012). Isso pode ter acontecido no presente estudo, uma vez que é conhecido que a permanência de células de micro-organismos viáveis que sobrevivem ao processo de desinfecção tem a capacidade de restaurar o biofilme, sustentando uma fonte de contaminação e, conseqüentemente, criando uma infecção persistente (PELLIZZARO et al., 2012; ROSSI et al., 1996; SMITH; HUNTER, 2008). Uma concentração maior dessa solução provavelmente seria necessária para eliminar completamente a possibilidade de recolonização (ALTIERI et al., 2012). Por outro lado, imersões em hipoclorito de sódio a 2%, ainda que em curtos períodos, demonstraram causar efeitos deletérios sobre as propriedades da resina acrílica, como redução na dureza, aumento da rugosidade superficial (PINTO LDE et al., 2010) e alteração de cor (PISKIN; SIPAHI; AKIN, 2014). É importante ressaltar que, mesmo na concentração utilizada neste estudo (1%), após 1,5 ano de imersão noturna simulada, o hipoclorito de sódio resultou em pequena, mas significativa alteração deletéria às propriedades de dentes artificiais (PISANI; MACEDO; et al., 2012), resinas acrílicas (PISANI et al., 2010) e reembasadores para base de prótese (PISANI; DA SILVA; et al., 2012). Ainda, tem sido demonstrado que essas alterações de propriedades passam a ser inaceitáveis com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio (5,25%) ainda que em imersões diárias curtas (5 e 15 min) (PISKIN et al., 2014; POLYZOIS et al., 2013).

A substantividade da clorexidina tem sido conhecida por assegurar sua liberação gradual e disponibilidade do local de uso por um tempo considerável, resultando em efetividade prolongada por períodos maiores de avaliação (HENNESSEY, T. S., 1973; REDDING et al., 2009; SPIECHOWICZ et al., 1990), mesmo em concentrações menores que a utilizada neste estudo (SINGH et al., 2014). O mecanismo de ação antibacteriano da clorexidina pode ser explicado pela sua estrutura molecular dicatiônica. A molécula catiônica da clorexidina é rapidamente atraída para a superfície da célula bacteriana, tipicamente carregada negativamente, resultando em uma ligação que altera a integridade da membrana celular (DENTON, 1991; JONES, 1997). Estudos in vitro (DABROWSKA et al., 2006; HUGO; LONGWORTH, 1964) mostraram que, em baixas concentrações, a clorexidina se liga a fosfolípidos da membrana microbiana, aumentando sua

permeabilidade, o que leva a evasão de componentes de baixo peso molecular. Já em concentrações mais elevadas, a clorexidina provoca na célula microbiana precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas com consequente morte celular (DABROWSKA et al., 2006; HUGO; LONGWORTH, 1964). Desta forma, esse antisséptico apresenta efeitos distintos em diferentes concentrações; as baixas tem ação bacteriostática enquanto que as mais elevadas são consideradas bactericidas. Os níveis reais em que os efeitos bacteriostáticos e bactericidas se manifestam variam entre as espécies microbianas (DENTON, 1991; JONES, 1997).

Na presente investigação, a ação antimicrobiana das soluções impregnadas às amostras acrílicas submetidas ao período de 1,5 ano de imersão em clorexidina (T183) se mostrou superior àquela referente a 9 meses (T91). Isso sugere que o tempo prolongado a exposição da prótese aos ciclos de imersão em clorexidina pode potencializar seu efeito antimicrobiano residual.

Depois de mensurada a ação antimicrobiana residual dos agentes de limpeza testados neste estudo, seus possíveis efeitos citotóxicos sobre fibroblastos gengivais humanos foram então avaliados. Os fibroblastos gengivais são as células que entram em contato com a resina acrílica da base das próteses nas situações clínicas, principalmente quando ocorrem ulcerações orais (CHEN; WU; CHENG, 2014; LEE et al., 2015). Outras razões para as células L929 terem sido utilizadas nesta pesquisa consistem no fato de serem recomendadas pelos padrões internacionais para testes de dispositivos médicos utilizados em Odontologia (ISO 7405, 2008) e apresentarem resultados mais precisos na determinação de efeitos citotóxicos quando comparadas às células de origem animal (CHEN; WU; CHENG, 2014).

Diversas metodologias podem ser utilizadas para determinar a citotoxicidade dos diferentes biomateriais. Apesar do ensaio de ^3H -timidina, que consiste na contagem do número de células que sintetizam DNA, ser considerado um teste preciso, atualmente vem sendo menos utilizado em experimentos por causa do alto custo, necessidade de tecnologia avançada e, sobretudo, pelos resíduos radioativos associados (WAGNER; BURKHARDT; FAILING, 1999). O ensaio colorimétrico do MTT foi selecionado neste estudo por ser bem estabelecido para determinar a viabilidade celular, inclusive em pesquisas em citotoxicidade de diversos materiais para base de próteses removíveis (CHEN; WU; CHENG, 2014; HUANG et al., 2001; LEE et al., 2015; SONG et al., 2014). O teste do MTT também é considerado um

método simples, rápido, objetivo e preciso (CHEN; WU; CHENG, 2014). Além disso, esse ensaio apresenta a vantagem de identificar alterações no metabolismo e na função celular decorrente do contato entre as células e os materiais, mesmo na ausência de morte celular (CIAPETTI et al., 1993)

O potencial de citotoxicidade das soluções de limpeza testadas neste estudo foi avaliado previamente, porém de forma direta sobre diversos tipos de células (ARABACI et al., 2013; GIANNELLI et al., 2008; HIDALGO et al., 2002; HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001; SAGRIPANTI; BONIFACINO, 2000). Não foram encontrados estudos na literatura pertinente sobre o potencial citotóxico residual dessas soluções de limpeza por meio do que fica incorporado às bases acrílicas durante a vida útil das próteses. Dessa forma, presume-se que apenas as comparações indiretas com os resultados obtidos nesta investigação possam ser estabelecidas.

De acordo com os resultados do presente estudo, os menores valores de viabilidade celular foram encontrados para os corpos de prova imersos em digluconato de clorexidina em ambos os períodos avaliados (T91 e T183). Esse achado pode ser atribuído ao alto poder de incorporação da clorexidina à resina acrílica (relacionado à substantividade), o que foi constatado no experimento de CIM, bem como à sua maior concentração em relação ao hipoclorito de sódio, já discutido previamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Arabaci et al. (2013), que encontraram efeitos genotóxicos e citotóxicos de soluções de clorexidina aplicadas diretamente em linfócitos humanos *in vitro*, os quais foram dose-dependentes. Os autores observaram que a clorexidina não afetou a proliferação celular dos linfócitos nas concentrações de 0,05, 0,1 ou 0,2 mg/mL, mas a reduziu significativamente nas concentrações de 0,4 e 0,5 mg/mL. Giannelli et al. (2008) investigaram a citotoxicidade *in vitro* da clorexidina em concentrações menores que a utilizada no presente estudo sobre diferentes tipos de células presentes na cavidade oral. Segundo os autores, a aplicação direta de clorexidina pode ter efeitos tóxicos graves sobre os fibroblastos gengivais, células endoteliais e, em particular, sobre os osteoblastos alveolares. O estudo *in vitro* de Hidalgo e Dominguez (2001) também concluiu que a clorexidina, mesmo em concentrações muito inferiores às utilizadas na prática clínica, têm efeitos adversos significativos sobre o crescimento de fibroblastos da derme humana quando utilizada diretamente sobre os mesmos. Ainda que utilizada de forma indireta nesta pesquisa, a solução de clorexidina a 2% que ficou incorporada à resina para base protética apresentou efeito intensamente

citotóxico aos fibroblastos gengivais humanos. Assim, para o digluconato de clorexidina ser utilizado com segurança pelos pacientes para imersão noturna de suas próteses, concentrações inferiores àquela recomendada na literatura para esse tipo de limpeza devem ser testadas em estudos futuros de citotoxicidade da solução residual da base protética.

O hipoclorito de sódio a 1% incorporado à resina acrílica dos corpos de prova deste estudo apresentou discreto efeito citotóxico sobre os fibroblastos gengivais humanos, independente do período avaliado. Isso não era esperado, haja vista que tem sido relatado que concentrações dessas soluções superiores a 0,05%, quando aplicadas diretamente sobre fibroblastos da derme humana, resultaram em 100% de morte celular, independentemente do tempo de exposição (HIDALGO et al., 2002). Têm sido observado maior potencial citotóxico dessa solução em altas concentrações após contato direto com variados tipos células. Sagripanti e Bonifacino (2000) encontraram toxicidade moderada para o hipoclorito de sódio a 4%, indicado como desinfetante químico, quando em contato direto com diversos tipos de células animais e humanas. Os resultados do estudo de Pashley et al. (1985) demonstraram que o hipoclorito de sódio a 5% foi extremamente citotóxico quando utilizado diretamente sobre células sanguíneas e tecido ocular de coelhos. Dessa forma, de acordo com os resultados deste estudo, apesar do efeito citotóxico da solução de hipoclorito de sódio a 1% ter sido discreto e, portanto, recomendado para imersão noturna em longo prazo de próteses removíveis, sua ação antimicrobiana residual foi inadequada. Assim, investigações futuras devem avaliar os efeitos antimicrobianos residuais e citotóxicos dessa solução incorporada à resina acrílica em concentrações superiores às recomendadas pela literatura para imersão noturna de prótese (0,5 e 1%), mas inferiores às utilizadas previamente (4 e 5%) nos estudos supracitados (PASHLEY et al., 1985; SAGRIPANTI; BONIFACINO, 2000). Espera-se, pelos resultados obtidos, que o efeito residual do hipoclorito de sódio em concentrações de 2 a 2,5% quando incorporado à resina acrílica, tenha maior efeito antimicrobiano e menos citotoxicidade às células bucais humanas.

No presente estudo, os valores de viabilidade celular obtidos para os corpos de provas imersos em hipoclorito de sódio a 1% não apresentaram diferença significativa das amostras imersas em água destilada ou das amostras de resina acrílica não imersas em qualquer tipo de solução (entre 50 e 75% em relação ao controle negativo). Esse efeito citotóxico discreto apresentado pelas amostras de

acrílicas não imersas em agentes químicos pode ser explicado pela citotoxicidade apresentada pelos componentes desses materiais (HUANG et al., 2001; KALLUS, 1984; MCCABE; BASKER, 1976; WEAVER; GOEBEL, 1980). Em uma revisão da literatura, Jorge et al. (2003), concluíram que o efeito citotóxico das resinas acrílicas para base de prótese está relacionado à liberação de componentes remanescentes que não reagiram após o processo de polimerização bem como à concentração de monômero residual, resultante da conversão incompleta de monômeros em polímeros. Esse efeito varia de acordo o tempo de armazenagem, a proporção de pó-líquido e os métodos e as condições de polimerização da resina acrílica.

As limitações do presente estudo incluem o fato de os experimentos terem sido realizados *in vitro* e não *in vivo* e de apenas uma única linha de células ter sido utilizada (L929). Estudos anteriores mostram que diferentes linhagens celulares manifestam diferentes sensibilidades para biomateriais. (CHEN; WU; CHENG, 2014; MOHARAMZADEH et al., 2009). Além disso, como mencionado previamente, outras concentrações de agentes de limpeza, que não as comumente recomendadas para imersão noturna das próteses removíveis, poderiam ser testadas.

Os resultados desta pesquisa *in vitro* devem ser aplicados às condições clínicas com cautela. Os pacientes usuários de prótese removíveis costumam associar diferentes métodos de higienização de suas próteses e normalmente escovam suas próteses antes de imergi-las nas soluções de limpeza, o que pode resultar em alterações superficiais que interferem no grau de incorporação desses agentes. Também é importante considerar que, durante o uso, as próteses na cavidade bucal estão em constante contato com a saliva, alimentos e outro líquidos, podendo sofrer alterações térmicas e variações de pH (CHEN; WU; CHENG, 2014), o que também pode influenciar na incorporação e liberação dos agentes químicos de limpeza da resina acrílica. Além disso, outros ensaios complementares para avaliar a citotoxicidade poderiam ter sido empregados, como o teste de sobreposição em ágar, o ensaio de apoptose por citometria de fluxo e a análise da morfologia celular por MEV.

Embora os testes de citotoxicidade *in vitro* apresentem variáveis mais fáceis de serem controladas quando comparados àqueles *in vivo*, são considerados restritos do ponto de vista clínico. Isso porque os efeitos de testes *in vitro*, realizados em células, são mais acentuados que os em condições bucais. (CHAVES et al., 2010; HUANG et al., 2001). Por outro lado, esses testes são importantes na

definição do comportamento biológico de materiais utilizados na clínica odontológica, permitindo uma comparação entre produtos e, no caso deste estudo, resultando em informações para a escolha de um agente químico de limpeza mais biocompatível (CHAVES et al., 2010; JORGE et al., 2003). Como os resultados de testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas, pesquisas in vivo em animais e posteriormente ensaios clínicos em humanos também são sugeridas para determinar a segurança biológica das soluções de limpeza indicadas para imersões de próteses a longo prazo.

De acordo com os resultados do presente estudo, fica evidente a necessidade de uma maior compreensão dos efeitos citotóxicos mediados pelos agentes químicos de limpeza incorporados em próteses acrílicas sobre células da mucosa oral. Estudos futuros são necessários para o desenvolvimento de estratégias eficazes destinadas a prevenir o dano celular induzido por esses compostos e limitar seus efeitos adversos aos pacientes os utilizam na prevenção da formação de biofilme protético e no auxílio ao tratamento da estomatite protética.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nas metodologias empregadas, a partir dos resultados obtidos e dentro das limitações deste estudo *in vitro*, foi possível concluir que:

- a imersão noturna simulada da resina acrílica para base de prótese em digluconato de clorexidina a 2% por 9 meses e 1,5 ano apresentou efeito antimicrobiano residual com inibição progressiva de crescimento de *C. albicans* e *S. aureus* ao longo dos 14 dias de incubação;

- o hipoclorito de sódio a 1% nos períodos simulados de imersão noturna (9 meses e 1,5 ano) das amostras resultou apenas em discreta inibição fúngica e bacteriana após 14 dias de incubação;

- o digluconato de clorexidina a 2% e o hipoclorito de sódio a 1% incorporados à resina acrílica para base de próteses removíveis em ambos os períodos de imersão noturna (9 meses e 1,5 ano) mostraram, respectivamente, efeitos intensamente e discretamente citotóxicos sobre os fibroblastos gengivais humanos de acordo com o método do MTT.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABELSON, D. C. Denture plaque and denture cleansers: review of the literature. **Gerodontology**, v. 1, n. 5, p. 202-6, Oct 1985.
- ALKAHTANI, A. et al. Cytotoxicity of QMix endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. **BMC Oral Health**, v. 14, p. 27, 2014.
- ALTIERI, K. T. et al. Eradication of a mature methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. **Braz Dent J**, v. 24, n. 5, p. 487-91, Sep-Oct 2013.
- ALTIERI, K. T. et al. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Am Dent Assoc**, v. 143, n. 3, p. 270-7, Mar 2012.
- ARABACI, T. et al. Assessment of cytogenetic and cytotoxic effects of chlorhexidine digluconate on cultured human lymphocytes. **Acta Odontol Scand**, v. 71, n. 5, p. 1255-60, Sep 2013.
- ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. Denture stomatitis: a review. **J Oral Rehabil**, v. 14, n. 3, p. 217-27, May 1987.
- ASAD, T.; WATKINSON, A. C.; HUGGETT, R. The effects of various disinfectant solutions on the surface hardness of an acrylic resin denture base material. **Int J Prosthodont**, v. 6, n. 1, p. 9-12, Jan-Feb 1993.
- ASSUNÇÃO, W. G. et al. Cleaning procedures for complete dentures. **JAO** v. 24 p. 32-35, 2001.
- BAENA-MONROY, T. et al. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 10 Suppl 1, p. E27-39, 2005.
- BANTING, D. W.; HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec Care Dentist**, v. 21, n. 1, p. 4-8, 2001.
- BARBEAU, J. et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 1, p. 51-9, Jan 2003.
- BARNABE, W. et al. 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**, v. 31, n. 5, p. 453-9, May 2004.
- BILHAN, H. et al. The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. **Clin Oral Investig**, v. 13, n. 4, p. 363-8, Dec 2009.

-
- BIZERRA, F. C. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res**, v. 8, n. 3, p. 442-50, May 2008.
- BUDTZ-JORGENSEN, E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand J Dent Res**, v. 82, n. 2, p. 151-90, 1974.
- BUDTZ-JORGENSEN, E. Materials and methods for cleaning dentures. **J Prosthet Dent**, v. 42, n. 6, p. 619-23, Dec 1979.
- BUDTZ-JORGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol Scand**, v. 48, n. 1, p. 61-9, Feb 1990.
- BUDTZ-JORGENSEN, E.; BERTRAM, U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. **Acta Odontol Scand**, v. 28, n. 1, p. 71-92, Mar 1970.
- BUDTZ-JORGENSEN, E.; LOE, H. Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. **Scand J Dent Res**, v. 80, n. 6, p. 457-64, 1972.
- BUERGERS, R. et al. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. **Acta Odontol Scand**, v. 66, n. 3, p. 174-80, Jun 2008.
- CAMPANHA, N. H. et al. The effect of long-term disinfection procedures on hardness property of resin denture teeth. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, p. e571-6, Jun 2012.
- CAMPOS M. S. et al. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, n. 5, p. 419-24, Oct 2008.
- CATALAN, A. et al. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 105, n. 3, p. 327-32, Mar 2008.
- CHANDRA, J. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J Dent Res**, v. 80, n. 3, p. 903-8, Mar 2001.
- CHANDRASEKHAR, V. et al. Evaluation of biocompatibility of a new root canal irrigant Q Mix 2 in 1- An in vivo study. **J Conserv Dent**, v. 16, n. 1, p. 36-40, Jan 2013.
- CHAU, V. B. et al. In-depth disinfection of acrylic resins. **J Prosthet Dent**, v. 74, n. 3, p. 309-13, Sep 1995.
- CHAVES, C. A. et al. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. **Dent Mater**, v. 26, n. 10, p. 1017-23, Oct 2010.
- CHEN, F.; WU, T.; CHENG, X. Cytotoxic effects of denture adhesives on primary human oral keratinocytes, fibroblasts and permanent L929 cell lines. **Gerodontology**, v. 31, n. 1, p. 4-10, Mar 2014.

CHOPDE, N. et al. Microbial colonization and their relation with potential cofactors in patients with denture stomatitis. **J Contemp Dent Pract**, v. 13, n. 4, p. 456-9, Jul-Aug 2012.

CIAPETTI, G. et al. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials**, v. 14, n. 5, p. 359-64, Apr 1993.

COELHO, C. M.; SOUSA, Y. T.; DARE, A. M. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. **J Oral Rehabil**, v. 31, n. 2, p. 135-9, Feb 2004.

DA SILVA, F. C. et al. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. **J Prosthodont**, v. 17, n. 8, p. 627-33, Dec 2008.

DA SILVA, P. M. et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e712-7, Nov 2011.

DABROWSKA, E. et al. Effect of chlorhexidine mouthrinse on cathepsin C activity in human saliva. **Adv Med Sci**, v. 51 Suppl 1, p. 96-9, 2006.

DAVENPORT, J. C. The oral distribution of candida in denture stomatitis. **Br Dent J**, v. 129, n. 4, p. 151-6, Aug 18 1970.

DAVI, L. R. et al. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. **Gerodontology**, v. 27, n. 4, p. 297-302, Dec 2010.

DE ANDRADE, I. M. et al. Effect of chlorhexidine on denture biofilm accumulation. **J Prosthodont**, v. 21, n. 1, p. 2-6, Jan 2012.

DENTON, G. W. Chlorhexidine. In: Block SS, ed. **Disinfection, Sterilization and preservation**. Philadelphia: Lea and Febiger, p. 274-89, 1991.

DILLS, S. S. et al. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. **J Prosthet Dent**, v. 60, n. 4, p. 467-70, Oct 1988.

EBRAHIMI SARAVI, M.; VOJDANI, M.; BAHRANI, F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. **J Dent (Tehran)**, v. 9, n. 4, p. 180-8, Fall 2012.

ELLEPOLA, A. N.; SAMARANAYAKE, L. P. Oral candidal infections and antimycotics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 11, n. 2, p. 172-98, 2000.

EREN, K.; OZMERIC, N.; SARDAS, S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. **Clin Oral Investig**, v. 6, n. 3, p. 150-4, Sep 2002.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL, M.; INFECTIOUS, D. EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. **Clin Microbiol Infect**, v. 6, n. 9, p. 509-15, Sep 2000.

FELIPUCCI, D. N. et al. Effect of different cleansers on the weight and ion release of removable partial denture: an in vitro study. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 5, p. 483-7, Oct 2011.

FELTON, D. et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. **J Prosthodont**, v. 20 Suppl 1, p. S1-S12, Feb 2011.

FIGUEIRAL, M. H. et al. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. **J Oral Rehabil**, v. 34, n. 6, p. 448-55, Jun 2007.

GENDREAU, L.; LOEWY, Z. G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. **J Prosthodont**, v. 20, n. 4, p. 251-60, Jun 2011.

GHABANCHI, J. et al. Effects of three Commercial Mouth Rinses on the Cultured Fibroblasts: An in Vitro Study. **J Dent (Shiraz)**, v. 14, n. 2, p. 64-7, Jun 2013.

GIANNELLI, M. et al. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 2, p. 308-17, Mar 2008.

GLASS, R. T. et al. Partial spectrum of microorganisms found in dentures and possible disease implications. **J Am Osteopath Assoc**, v. 101, n. 2, p. 92-4, Feb 2001.

GORNITSKY, M. et al. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. **J Can Dent Assoc**, v. 68, n. 1, p. 39-45, Jan 2002.

GREENSTEIN, G.; BERMAN, C.; JAFFIN, R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. **J Periodontol**, v. 57, n. 6, p. 370-7, Jun 1986.

HENNESSEY, T. S. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J Periodontal Res Suppl**, v. 12, p. 61-7, 1973.

HIDALGO, E.; BARTOLOME, R.; DOMINGUEZ, C. Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. **Chem Biol Interact**, v. 139, n. 3, p. 265-82, Mar 20 2002.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicol In Vitro**, v. 15, n. 4-5, p. 271-6, Aug-Oct 2001.

- [illegible]

- LAL, K. et al. Assessment of antimicrobial treatment of denture stomatitis using an in vivo replica model system: therapeutic efficacy of an oral rinse. **J Prosthet Dent**, v. 67, n. 1, p. 72-7, Jan 1992.
- LAMFON, H. et al. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. **FEMS Microbiol Lett**, v. 242, n. 2, p. 345-51, Jan 15 2005.
- LEE, Y. et al. Cytotoxicity of four denture adhesives on human gingival fibroblast cells. **Acta Odontol Scand**, v. 73, n. 2, p. 87-92, Feb 2015.
- LI, Y. C. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages in vitro. **Environ Toxicol**, v. 29, n. 4, p. 452-8, Apr 2014.
- MAHONEN, K.; VIRTANEN, K.; LARMAS, M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. **J Oral Rehabil**, v. 25, n. 4, p. 304-10, Apr 1998.
- MARTORI, E. et al. Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population. **J Prosthet Dent**, v. 111, n. 4, p. 273-9, Apr 2014.
- MCCABE, J. F.; BASKER, R. M. Tissue sensitivity to acrylic resin. A method of measuring the residual monomer content and its clinical application. **Br Dent J**, v. 140, n. 10, p. 347-50, May 18 1976.
- MCMULLAN-VOGEL, C. G. et al. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 14, n. 3, p. 183-9, Jun 1999.
- MIMA, E. G. et al. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. **J Prosthodont**, v. 17, n. 4, p. 312-7, Jun 2008.
- MIMA, E. G. et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 10, p. E380-8, Oct 2012.
- MIRHADI, H. et al. Cytotoxicity of chlorhexidine-hydrogen peroxide combination in different concentrations on cultured human periodontal ligament fibroblasts. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 11, n. 6, p. 645-8, Nov 2014.
- MOHARAMZADEH, K. et al. Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model. **J Periodontol**, v. 80, n. 5, p. 769-75, May 2009.
- MONTAGNER, H. et al. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. **J Appl Oral Sci**, v. 17, n. 5, p. 432-5, Sep-Oct 2009.
- NEPPELENBROEK, K. H. et al. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. **J Oral Rehabil**, v. 35, n. 11, p. 836-46, Nov 2008.

- NEWTON, A.V. Denture sore mouth as possible etiology. **Br. Dental J**, v. 112, p. 357-360, 1962.
- OLSEN, I. Denture stomatitis. Effects of chlorhexidine and amphotericin B on the mycotic flora. **Acta Odontol Scand**, v. 33, n. 1, p. 41-6, 1975.
- PARANHOS H, F. et al. Color stability, surface roughness and flexural strength of an acrylic resin submitted to simulated overnight immersion in denture cleansers. **Braz Dent J**, v. 24, n. 2, p. 152-6, 2013.
- PARASKEVAS, S. et al. The additional effect of a dentifrice on the instant efficacy of toothbrushing: a crossover study. **J Periodontol**, v. 78, n. 6, p. 1011-6, Jun 2007.
- PASHLEY, E. L. et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. **J Endod**, v. 11, n. 12, p. 525-8, Dec 1985.
- PAVAN, S. et al. Colonisation of soft lining materials by micro-organisms. **Gerodontology**, v. 27, n. 3, p. 211-6, Sep 2010.
- PAVARINA, A. C. et al. Effects of chemical disinfectants on the transverse strength of denture base acrylic resins. **J Oral Rehabil**, v. 30, n. 11, p. 1085-9, Nov 2003.
- PAVARINA, A. C. et al. Effect of microwave disinfection on the flexural strength of hard chairside reline resins. **J Dent**, v. 33, n. 9, p. 741-8, Oct 2005.
- PELLIZZARO, D. et al. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. **Braz Dent J**, v. 23, n. 5, p. 547-54, 2012.
- PEREIRA, C. A. et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 76, n. 4, p. 419-24, Aug 2013.
- PINTO LDE, R. et al. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard reline acrylic resins. **Gerodontology**, v. 27, n. 2, p. 147-53, Jun 2010.
- PIRES, F. R. et al. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. **J Oral Rehabil**, v. 29, n. 11, p. 1115-9, Nov 2002.
- PISANI, M. X. et al. Evaluation of experimental cleanser solution of *Ricinus communis*: effect on soft denture liner properties. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, p. e179-85, Jun 2012.
- PISANI, M. X. et al. The Effect of Experimental Denture Cleanser Solution *Ricinus communis* on Acrylic Resin Properties. **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 13, n. 3, p. 369-373, Jul-Sep 2010.
- PISANI, M. X. et al. Effect of experimental *Ricinus communis* solution for denture cleaning on the properties of acrylic resin teeth. **Braz Dent J**, v. 23, n. 1, p. 15-21, 2012.

- PISKIN, B.; SIPAHI, C.; AKIN, H. Effect of different chemical disinfectants on color stability of acrylic denture teeth. **J Prosthodont**, v. 23, n. 6, p. 476-83, Aug 2014.
- POLYZOIS, G. et al. The effect of immersion cleansers on gloss, colour and sorption of acetal denture base material. **Gerodontology**, v. 30, n. 2, p. 150-6, Jun 2013.
- RAMAGE, G. et al. Denture stomatitis: a role for Candida biofilms. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 98, n. 1, p. 53-9, Jul 2004.
- RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by Candida albicans. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 4, p. 163-70, Dec 2001.
- REDDING, S. et al. Inhibition of Candida albicans biofilm formation on denture material. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 5, p. 669-72, May 2009.
- RIBEIRO, D. A. et al. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 5, p. 358-61, Oct 2004.
- RITCHIE, G. M. et al. The etiology, exfoliative cytology, and treatment of denture stomatitis. **J Prosthet Dent**, v. 22, n. 2, p. 185-200, Aug 1969.
- RODRIGUEZ ACOSTA, E. J. et al. Candida albicans Adherence to Denture Base Material: Chemical Disinfection and the Effect of Acquired Salivary Pellicle Formation. **J Prosthodont**, Aug 20 2014.
- ROSSATO, M. B. et al. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. **Oral Health Prev Dent**, v. 9, n. 3, p. 221-7, 2011.
- ROSSI, T. et al. Eradication of the long-term carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in patients wearing dentures: a follow-up of 10 patients. **J Hosp Infect**, v. 34, n. 4, p. 311-20, Dec 1996.
- SAGRIPANTI, J. L.; BONIFACINO, A. Cytotoxicity of liquid disinfectants. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 1, n. 1, p. 3-14, 2000.
- SALERNO, C. et al. Candida-associated denture stomatitis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 2, p. e139-43, Mar 2011.
- SANITA, P. V. et al. Candida spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 111, n. 6, p. 726-33, Jun 2011.
- SATO, M. et al. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. **Aust Dent J**, v. 42, n. 5, p. 343-6, Oct 1997.
- SHETTY, A. V. et al. Antimicrobial activity and stability of electron beam irradiated dental irrigants. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 11, p. DC21-4, Nov 2014.

SILVA, M. M. et al. Comparison of denture microwave disinfection and conventional antifungal therapy in the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 114, n. 4, p. 469-79, Oct 2012.

SINGH, H. et al. Evaluation of three different concentrations of Chlorhexidine for their substantivity to human dentin. **Indian J Dent**, v. 5, n. 4, p. 199-201, Oct 2014.

SKUPIEN, J. A. et al. Prevention and treatment of Candida colonization on denture liners: a systematic review. **J Prosthet Dent**, v. 110, n. 5, p. 356-62, Nov 2013.

SMITH, K.; HUNTER, I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 8, p. 966-73, Aug 2008.

SONG, Y. H. et al. Cytotoxicity of soft denture lining materials depending on their component types. **Int J Prosthodont**, v. 27, n. 3, p. 229-35, May-Jun 2014.

SPIECHOWICZ, E. et al. In vitro study on the inhibiting effect of different agents on the growth of Candida albicans on acrylic resin surfaces. **Quintessence Int**, v. 21, n. 1, p. 35-40, Jan 1990.

TANG, A. T. et al. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. **J Biomed Mater Res**, v. 45, n. 3, p. 214-22, Jun 5 1999.

TAY, L. Y. et al. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, p. e275-80, Jun 2012.

ULUDAMAR, A.; OZYESIL, A. G.; OZKAN, Y. K. Clinical and microbiological efficacy of three different treatment methods in the management of denture stomatitis. **Gerodontology**, v. 28, n. 2, p. 104-10, Jun 2011.

WAGNER, U.; BURKHARDT, E.; FAILING, K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 70, n. 3-4, p. 151-9, Sep 20 1999.

WEAVER, R. E.; GOEBEL, W. M. Reactions to acrylic resin dental prostheses. **J Prosthet Dent**, v. 43, n. 2, p. 138-42, Feb 1980.

WEBB, B. C.; THOMAS, C. J.; WHITTLE, T. A 2-year study of Candida-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. **Gerodontology**, v. 22, n. 3, p. 168-76, Sep 2005.

WEBB, B. C. et al. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. **Aust Dent J**, v. 43, n. 4, p. 244-9, Aug 1998.

ZOMORODIAN, K. et al. Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Med Mycol**, v. 49, n. 2, p. 208-11, Feb 2011

Anexos

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO ANTIMICROBIANO RESIDUAL E CITOTOXICIDADE IN VITRO DE RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE APÓS IMERSÃO PROLONGADA EM AGENTES DE LIMPEZA

Pesquisador: Andréa Lemos Falcão Procópio

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39465514.9.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 911.526

Data da Relatoria: 09/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto intitulado "EFEITO ANTIMICROBIANO RESIDUAL E CITOTOXICIDADE IN VITRO DE RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE APÓS IMERSÃO PROLONGADA EM AGENTES DE LIMPEZA", de autoria de Andréa Lemos Falcão Procópio, sob a orientação da profª Drª Karin Hermana Neppelenbroek. O presente projeto irá avaliar in vitro o efeito antimicrobiano residual e a citotoxicidade in vitro de uma resina acrílica termopolimerizável para base de prótese submetida a longo período de imersão diária em dois agentes químicos (hipoclorito de sódio e clorexidina) amplamente utilizados para a prevenção e como meio auxiliar no tratamento da estomatite protética. Discos (10 mm x 1 mm) de resina acrílica termopolimerizável (Lucitone 550) serão submetidos a três ciclos diários de desinfecção (8h/cada) em hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina a 2% ou água destilada (controle) durante 91 dias (T91) ou 183 dias (T183), simulando o período de 1,5 ano ou 9 meses de imersão noturna diária realizada pelo paciente. Inicialmente, será utilizado o método de concentração inibitória mínima (CIM) em caldo para conhecer o efeito residual (incorporação) das soluções à resina acrílica. Metade dos discos imersos em cada agente de limpeza em um dos tempos de imersão (n=5) será inoculada (1x10⁷cells/mL) com um dos patógenos associados à estomatite protética: C. albicans e S. aureus. Os discos serão incubados a 37oC para análise em espectrofotômetro após 24h, 7 e 14 dias,

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 911.526

então, os valores de absorbância serão convertidos em porcentagens de inibição microbiana. Confirmada a ação antimicrobiana residual dos agentes de limpeza incorporados à resina acrílica, será analisada sua citotoxicidade in vitro sobre fibroblastos gengivais humanos. Os efeitos citotóxicos serão avaliados por meio do ensaio colorimétrico MTT após as células serem expostas por 24h aos corpos de prova (n=3) previamente imersos em uma das soluções por um dos períodos avaliados (T91 ou T183). Os experimentos serão realizados em sextuplicatas e a citotoxicidade será determinada com base na atividade mitocondrial em comparação a corpos de prova não submetidos à imersão nas soluções testadas. Os resultados da ação antimicrobiana e citotoxicidade obtidos para os grupos experimentais (agentes de limpeza) serão comparados com o controle (água) nos diferentes períodos testados e os dados obtidos analisados estatisticamente (=5%).

A hipótese nula investigada neste estudo é que o efeito residual dos agentes de limpeza incorporados na resina acrílica não resultará em resultados citotóxicos nas células humanas

Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto tem como proposta avaliar in vitro o efeito antimicrobiano residual e a citotoxicidade de uma resina acrílica termopolimerizável para base de prótese submetida a longo período de imersão diária em dois agentes químicos amplamente utilizados para a prevenção e tratamento adjunto da estomatite protética.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos envolvidos serão provenientes da cirurgia que será realizada nos pacientes durante a pesquisa "Avaliação do recobrimento radicular pela técnica de enxerto conjuntivo subepitelial associado ao condicionamento radicular com ácido cítrico ou terapia fotodinâmica - estudo clínico randomizado", já aprovada por este CEP e que irá ceder o material residual armazenado para a pesquisa em questão, e são aqueles comuns a qualquer tratamento odontológico (pequeno sangramento durante a limpeza, sensibilidade, pequeno desconforto), que ocorreriam, mesmo que não estivesse participando da pesquisa. A presente pesquisa, como irá trabalhar com material biológico armazenado não apresenta riscos.

Benefícios:

Avaliar se os agente químicos de limpeza, amplamente utilizados por paciente usuários de prótese totais, podem causar algum efeito citotóxico aos tecidos bucais do paciente.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP**

Continuação do Parecer: 911.526

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que pretende avaliar in vitro o efeito antimicrobiano residual e a citotoxicidade de uma resina acrílica termopolimerizável para base de prótese submetida a longo período de imersão diária em dois agentes químicos amplamente utilizados para a prevenção e tratamento adjunto da estomatite protética. Não existem praticas invasivas ou qualquer problema que torne a pesquisa inviável do ponto de vista ético. A pesquisadora possui os documentos necessários para a efetivação de sua pesquisa, principalmente o termo de cessão de tecidos humanos assinado pela Profª Drª Carla Andreotti Damante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos necessários para que seja avaliada a presente pesquisa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem praticas invasivas ou qualquer problema que torne a pesquisa inviável do ponto de vista ético. A pesquisa está bem estruturada. A pesquisadora não trabalhará diretamente com seres humanos e o material biológico usado na pesquisa foi conseguido segundo as normas éticas estabelecidas pelas resoluções vigentes no país, conforme se atesta pelo termo de cessão de tecidos humanos assinado pela Profª Drª Carla Andreotti Damante. Por isso, sou de parecer pela aprovação da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do CEP de 10.12.2014, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 911.526

BAURU, 12 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Flaviana Bombarda de Andrade
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br