UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

PRISCILLA NEVES RAILE

Análise da ação antimicrobiana de soluções experimentais de *Ricinus communis*,
cloreto de cetilpiridínio e peróxido alcalino em superfície de liga metálica de Cobalto
Cromo

VERSÃO CORRIGIDA

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, junto ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia do Área de Concentração:
Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Raile, Priscilla Neves

Análise da ação antimicrobiana de soluções experimentais de *Ricinus communis*, cloreto de cetilpiridínio e peróxido alcalino em superfície de liga metálica de Cobalto Cromo.

Ribeirão Preto, 2017.

135 p.: 22 il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Pagnano, Valéria Oliveira.

1. Higienizadores para próteses. 2. Peróxidos alcalinos. 3. Ação antimicrobiana. 4. Liga metálica. 5. *Ricinus communis*

FOLHA DE APROVAÇÃO

PRISCILLA NEVES RAILE

Análise da ação antimicrobiana de soluções experimentais de *Ricinus communis*, cloreto de cetilpiridínio e peróxido alcalino em superfície de liga metálica de Cobalto Cromo

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Departamento de Materiais Dentários e Prótese.

.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Defesa em: ____/____/ 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, **Marisol F. Neves Raile** e **Vicente Raile Júnior**, que são seres humanos tão únicos e foram capazes de abrir mão de si mesmos, inúmeras vezes, pela minha formação. Agradeço descomedidamente a confiança que sempre tiveram em mim e na minha capacidade, por todos os valores e por manterem meus pés no chão.

À minha irmã, **Mirella Neves Raile**, destinada a ser parceira de vida e grande motivadora. Exemplo de mulher e de força. Obrigada por todos os ensinamentos e paciência com meus desabafos durante toda essa vida.

Ao meu amor, **Heitor Fontes da Silva**, que foi tão companheiro em todos os momentos, tornando meus dias mais leves e com mais amor. Obrigada por todo apoio e torcida. Você me faz querer ser melhor todos os dias.

Aos meus avós **Benedicto Neves**, **Ondina Neves**, **Helle Nice Raile** e **Vicente Raile**, pelo amor e carinho dedicados a mim sempre, pelos exemplos de vida e por plantarem a semente de toda essa jornada. Sem vocês, nada seria possível.

Ao meu grande amigo **Yan Kawabe**, por dividir tantos momentos de sinceridade comigo nesses anos de amizade, sempre estando presente em minha vida, me motivando e me dando forças.

Agradecimiento
especial

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Valéria O. Pagnano de Souza**, que foi tão amiga e companheira em todos os momentos. Sempre me motivando e me proporcionando tantas oportunidades. Obrigada por toda dedicação, ajuda e preocupação comigo. Algumas pessoas possuem um brilho especial pela sua humanidade e empatia. Com certeza você é uma delas. Foi um processo de muito crescimento pessoal e agradeço por sempre estar ao meu lado, me apoiando acima de tudo. De muitas formas, você é uma inspiração. Meu eterno agradecimento!

Agradecimientos

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP)**, pela oportunidade de cursar o Mestrado e adquirir valiosos conhecimentos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** (Área de concentração: Reabilitação Oral) que nos oferece uma educação de excelência.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da FORP-USP, **Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida Antunes**, pelos ensinamentos, dedicação e comprometimento com a nossa formação.

A todos os **professores** do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP, pela inspiração e participação intensa na minha formação acadêmica.

Aos queridos professores, **Takami Hotta, Wilson Matsumoto, Regina Maura Fernandes, Christiano Oliveira, Helena de Freitas Oliveira Paranhos, Cláudia Helena Lovato da Silva, Mariane Gonçalves, Maria de Fátima Jurca da Motta, Izabel Cristina Fröner**, por serem grandes inspirações de vida e profissão, exemplos de ética e dedicação. Agradeço pelas portas abertas e todo o carinho. Espero retribuir a alguém um dia, o que fizeram por mim.

À minha parceira de trabalho, **Patrícia Almeida Curylofo**, que foi tão presente em todos os momentos. Mais do que ajuda, você me deu forças e foi grande responsável pelo êxito nessa etapa da minha vida. Agradeço imensamente pelo companheirismo, amizade e troca de experiências. Foram muitos momentos de tensão e alegria que estivemos juntas. Você foi um presente.

Aos meus queridos **amigos da Pós-Graduação**, pelos momentos de boas risadas, descontração e trabalhos em equipe.

À técnica do Laboratório de Metrologia, **Ana Paula Macedo**, que contribuiu de forma decisiva no desenvolvimento desse trabalho. Meu sincero agradecimento pela paciência, ensinamentos, imensa ajuda e dedicação.

À técnica do Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da FORP-USP, **Viviane de Cássia Oliveira**, pelos ensinamentos, companhia, sinceridade e paciência. É com muito carinho que agradeço por toda dedicação e ajuda para que esse trabalho se concretizasse.

Ao **Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon** pela disponibilidade para realizar a fundição dos corpos de prova.

Aos técnicos **José de Godoi Filho, Luiz Sérgio Soares, Marcelo Aparecido Vieira e Fernando Schiavetto** pelo suporte técnico e disposição para ajudar no que fosse preciso para execução deste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Materiais Dentários da FORP-USP, **Regiane Damasceno Tirado, Fernanda Talita de Freitas e Denise Martins Fontes Gonçalves**, pela disponibilidade e atenção para sanar as inúmeras dúvidas durante esse tempo de trabalho.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação, **Regiane Moi, Isabel Sola e Mary Possani**, pela disponibilidade e eficiência em ajudar no que fosse necessário.

À **ACECIL - Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda**, pela esterilização dos corpos de prova.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que participaram de forma direta ou indireta para que este trabalho se tornasse realidade, meu sincero agradecimento.

Epígrafe

Samba da Bênção

Vinicius de Moraes

*É melhor ser alegre que ser triste
Alegria é a melhor coisa que existe
É assim como a luz no coração*

*Mas pra fazer um samba com beleza
É preciso um bocado de tristeza
É preciso um bocado de tristeza
Senão, não se faz um samba não*

*Senão é como amar uma mulher só linda
E daí? Uma mulher tem que ter
Qualquer coisa além de beleza
Qualquer coisa de triste
Qualquer coisa que chora
Qualquer coisa que sente saudade
Um molejo de amor machucado
Uma beleza que vem da tristeza
De se saber mulher
Feita apenas para amar
Para sofrer pelo seu amor
E pra ser só perdão*

*Fazer samba não é contar piada
E quem faz samba assim não é de nada
O bom samba é uma forma de oração*

*Porque o samba é a tristeza que balança
E a tristeza tem sempre uma esperança
A tristeza tem sempre uma esperança
De um dia não ser mais triste não*

*Feito essa gente que anda por aí
Brincando com a vida
Cuidado, companheiro!
A vida é pra valer
E não se engane não, tem uma só
Duas mesmo que é bom
Ninguém vai me dizer que tem
Sem provar muito bem provado
Com certidão passada em cartório do céu
E assinado embaixo: Deus
E com firma reconhecida!
A vida não é brincadeira, amigo
A vida é arte do encontro
Embora haja tanto desencontro pela vida
Há sempre uma mulher à sua espera*

*Com os olhos cheios de carinho
E as mãos cheias de perdão
Ponha um pouco de amor na sua vida
Como no seu samba*

*Ponha um pouco de amor numa cadência
E vai ver que ninguém no mundo vence
A beleza que tem um samba, não*

Resumo

RAILE, P.N.R. **Análise da ação antimicrobiana de soluções experimentais de *Ricinus communis*, peróxido alcalino e cloreto de cetilpiridínio em superfície metálica de Cobalto Cromo.** Ribeirão Preto, 2017. 135 p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

A ação antimicrobiana de soluções higienizadoras é um aspecto importante a ser avaliado para sua indicação como método associado à escovação, para higienização de Próteses Parciais Removíveis (PPRs). Este estudo avaliou, por meio de metodologia *in vitro*, a capacidade de soluções higienizadoras em reduzir as unidades formadoras de colônia (UFC) de biofilmes formados sobre a superfície da liga de cobalto cromo (Co-Cr). 240 espécimes metálicos de Co-Cr circulares (12 mm x 3 mm) foram obtidos de padrões de cera confeccionados a partir de uma matriz metálica. Após fundição, os espécimes foram polidos de forma padronizada e esterilizados por óxido de etileno. Divididos aleatoriamente, os espécimes (n=9) foram contaminados com: *Candida albicans* (Ca), *Candida glabrata* (Cg), *Streptococcus mutans* (Sm) ou *Staphylococcus aureus* (Sa) e biofilme multiespécies (BM), o qual continha todos os microrganismos estudados. A adesão dos microrganismos ocorreu em 1 hora e 30 minutos em estufa incubadora a 37°C. A maturação do biofilme foi obtida em 48 horas, com troca de meio após 24 horas, também a 37°C, sendo que para Sm e BM o processo ocorreu em microaerofilia. Os espécimes contaminados foram imersos em *Ricinus communis* a 2% (Rc 2%- 20 min), *Ricinus communis* a 10% (Rc 10%- 20 min), cloreto de cetilpiridínio a 0,05% (Cepacol) (CPC- 10 min), pastilhas efervescentes (NitrAdine) (NA-15 min) e água destilada (AD- 20 min). Após as imersões, os espécimes foram colocados em meio Leethen Broth e agitados para desprendimento das células viáveis. As suspensões obtidas foram diluídas seriadamente (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) e semeadas em meios específicos para contagem das UFC/mL. A partir dos valores de UFC foram calculados os valores de $\text{Log}_{10}(\text{UFC}+1)$ para análise estatística ($\alpha=0,05$). A distribuição dos dados para Sa, Sm em culturas isoladas e para os microrganismos do biofilme multiespécies apresentou-se não normal, tendo sido utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Para Ca e Cg, a distribuição dos dados apresentou-se normal, tendo sido utilizados ANOVA e teste de Tukey. Em biofilmes isolados, os resultados mostraram eficiência do NA na redução de Cg (p=0,001), Sa (p=0,012) e Sm (p=0,002). Nenhuma das soluções apresentou redução significativa de Ca. Dentro do grupo BM, CPC (p=0,035) e NA (p=0,006) reduziram UFC/mL de Cg. NA (p=0,01) foi eficaz contra Sm e nenhuma das soluções apresentou redução de Ca e Sa. Conclui-se que o peróxido alcalino foi o higienizador mais efetivo em relação à maioria dos microrganismos avaliados, mas nenhuma solução apresentou ação contra Ca em superfícies metálicas de Co-Cr.

Palavras-chave: Higienizadores para próteses, peróxido alcalino, *Ricinus communis*, cloreto de cetilpiridínio, ação antimicrobiana, liga de cobalto cromo.

Abstract

RAILE, PNR. Antimicrobial action of experimental solutions of *Ricinus communis*, alkaline peroxide and cetylpyridinium chloride in cobalt chromium surface. Ribeirão Preto, 2017. 135 p. Dissertation (Master's Degree in Oral Rehabilitation) Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

The evaluation of antimicrobial action of denture cleansers is an important aspect to be investigated to able a denture cleanser to be associated with mechanical method and used to clean removable partial dentures (RPD). This study analyzed *in vitro* antimicrobial action of cleanser solutions on cobalt chromium (Co-Cr) alloy, reducing the Colony Forming Units (CFU) on biofilms. The specimens (n=240) were obtained from wax patterns (12 mm x 3 mm), made in a metal matrix. Specimens were polished in a standard way and sterilized with ethylene oxide. Randomly divided, the specimens were contaminated with suspension of *Candida albicans* (Ca), *Candida glabrata* (Cg), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Streptococcus mutans* (Sm) and multispecies biofilm (MB), with contained all the microorganisms. The adhesion of microorganisms occurred in 1 hour and 30 minutes in an incubator oven at 37°C. The biofilm growth occurred on 48 hours, with medium change every 24 hours, also at 37°C, while Sm and MB process occurred in microaerophilic. Contaminated specimens were immersed in solutions as the following groups (n=9): A- experimental solution of *Ricinus communis* 2% (Rc 2%- 20 min.); B- experimental solution of *Ricinus communis* 10% (Rc 10%- 20 min.); C- cetylpyridinium chloride 0.500 mg - Cepacol (CPC- 10 min.); D- effervescent tablet - Nitradine (NA- 15 min.); E- distilled water (DW- 20 min.). The specimens were immersed in medium Letheen from which were obtained aliquots. The aliquots were diluted, in 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} , then seeded to determine the number of CFU/ mL. From the CFU values, were calculated values of $\text{Log}_{10}(\text{CFU}+1)$ for statistical analysis ($\alpha=0,05$). The distribution of data was observed in isolated Sa, Sm and all the groups of microorganisms in MB was not-normal. In this case, data were processed and Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0.05$) followed by Dunn's post test were used. In isolated biofilm of Ca e Sa, data presented normal distribution, so ANOVA followed by Tukey post test were used. In isolated biofilms, AP promoted significant reduction of CFU/mL of Cg (p=0.001), Sa (p=0.012), and Sm (p=0.002). None of the solutions presented difference statistic significant of Ca. In MB group, CPC (p=0.035) and AP (p=0.006) significantly reduced CFU/ml of Cg, and AP (p=0.01) of Sm, none of the solutions presented difference of Ca and Sa. It was concluded that alkaline peroxide was the most effective cleanser in reducing the number of CFU in the most of microorganisms, but no one was effective against Ca in Co-Cr metallic surfaces.

Keywords: Denture cleaners, alkaline peroxide, *Ricinus communis*, cetylpyridinium chloride, antimicrobial action, cobalt chromium alloy.

Sumário

SUMÁRIO

1.	Introdução	33
2.	Revisão de literatura	43
3.	Proposição	69
4.	Material e método	73
4.1.	Delineamento experimental	75
4.2.	Delineamento estatístico.....	77
4.3.	Confecção dos corpos de prova.....	77
4.4.	Cepas microbianas.....	83
4.5.	Divisão dos grupos experimentais.....	84
4.6.	Preparo dos meios de cultura.....	84
4.7.	Diluição dos microrganismos para inoculação do meio de cultura	86
4.8.	Contaminação dos espécimes metálicos	88
4.9.	Higienização dos espécimes metálicos	90
4.10.	Análise da viabilidade celular	95
4.11.	Análise estatística	95
5.	Resultados	97
5.1.	Análise da esterilidade.....	99
5.2.	Análise antimicrobiana.....	99
5.3.	Análise estatística.....	104
5.4.	Análise de viabilidade celular.....	106
6.	Discussão	109
7.	Conclusões	119
8.	Referências	123

1. Introdução

Mesmo com a constante diversidade de inovações em recursos reabilitadores, a opção de tratamento eleita deve se adequar com as individualidades da condição clínica do paciente. Sendo assim, ainda que exista crescente interesse no desenvolvimento de técnicas e materiais para reabilitações, muitas vezes as condições sistêmicas, psicológicas ou financeiras do paciente inviabilizam alguns tratamentos (Abere, 1979; Silva, PMD, et al., 2008).

Próteses Parciais Removíveis (PPRs) têm como objetivo restaurar e manter a função, proporcionar conforto, estética e saúde ao indivíduo parcialmente desdentado, por meio da substituição de dentes e tecidos ausentes por materiais artificiais (Carr, Brown, 2011). São dispositivos de custo relativamente baixo, conservadores, que requerem pouco desgaste da estrutura dentária, de fácil manutenção quando comparados a outros tipos de prótese, eficientes para casos de difícil resolução (Bergman et al., 1995) e ainda permitem planejamento versátil e grande possibilidade de indicações (Neto et al., 2011).

Não somente repor estruturas perdidas e reestabelecer a estética e função, mas, dentre os objetivos das reabilitações com PPR, está, sobretudo, a preservação das estruturas remanescentes (Carr, Brown, 2011). O uso de um aparelho protético implica em maior área de superfícies para aderência do biofilme, que se forma na prótese de modo semelhante aos dentes naturais. Sendo assim, é fundamental para o sucesso de qualquer tratamento, correto controle do acúmulo do biofilme, por meio de adequada orientação profissional quanto à rotina de higienização a ser executada (Bergman et al., 1995; Jagger, Harrison, 1995; Paranhos et al., 2009; Silva-Lovato et al., 2006; Silva, PMD, et al., 2008; Peracini et al., 2010; Gonçalves et al., 2011; Preshaw et al., 2011; Sesma, Marimoto, 2011; Neppelenbroek et al., 2015; Santos et al., 2016).

O biofilme é uma estrutura complexa, formada a partir de deposição tridimensional de comunidades de microrganismos estrutural e metabolicamente organizados em uma película adquirida sobre uma superfície, que se relacionam entre si e estão contidos em matriz extracelular (Ramage et al., 2004; Marsh, 2010). Essas comunidades vivem em equilíbrio dinâmico com seu ambiente e podem ter sua composição e atividade metabólicas significativamente adaptadas às mudanças na microbiota oral (como erupção dental, fluxo salivar, desordem imunológica) ou

ao estilo de vida do indivíduo (tabagismo, alteração na dieta, efeitos colaterais de medicamentos, etc) (Marsh, 2010; Wade, 2013; Marsh et al., 2015). Uma vez que uma superfície ou mucosa é colonizada por microrganismos pioneiros, outros poderão se agregar por interações específicas, favorecendo o desenvolvimento do biofilme (Kagermeier-Callaway et al., 2000; Wade, 2013).

A estomatite protética é uma condição comum de ser encontrada nos usuários de prótese. Manifesta-se como inflamação da mucosa oral e pode apresentar ausência de sintomatologia até ardência, desconforto ou dor severa (Coco et al., 2008). Estudos indicam que o desenvolvimento de estomatite protética está relacionado à presença de espécies *Candida* associadas a outros fatores como deficiências na higiene bucal e da prótese, traumas e doenças sistêmicas (Nikawa et al., 1998; Shay, 2000; Gordon et al., 2004; Ramage et al., 2004; Monroy et al., 2005; Coco et al. 2008; Santos et al., 2016). É consensual que a melhor abordagem para controle dessa infecção é a prevenção, envolvendo correta higiene bucal e adequados procedimentos de limpeza da prótese (Drake et al., 1992; Felton et al., 2011).

Além do efeito antiestético, a falta de higienização das estruturas artificiais favorece a sedimentação de bactérias e leveduras. A aspiração e deglutição contínuas de microrganismos provenientes do biofilme oral expõem os usuários de prótese, principalmente os imunocomprometidos e idosos com alguma debilidade, a outras infecções e complicações sistêmicas (Nikawa et al., 1998; Nikawa et al. 1999; Shay, 2000; Coulthwaite, Verran, 2007; Wade, 2013; Neppelenbroeket al., 2015; Sedrez-Porto, 2016).

Em pacientes dentados, a falta de controle do acúmulo de biofilme sobre os tecidos dentais pode implicar ainda em gengivite inflamatória, periodontite e cárie, prejudicando o prognóstico do tratamento e ocasionando progressão na perda de elementos dentais (Nikawa et al., 1999; Coulthwaite, Verran, 2007; Silva, PMD, et al., 2008; Takahashi, Nyvad, 2011; Marsh et al., 2015).

O biofilme se sedimenta preferencialmente em locais que oferecem menor exposição à ação salivar e a outros agentes naturais bucais de remoção mecânica. Portanto, áreas irregulares com potencial retentivo devem receber atenção redobrada durante a higienização. (Ramage et al., 2004; Coulthwaite, Verran, 2007; Paranhos et al., 2007b; Pereira-Cenci et al., 2008a; Sesma, Marimoto, 2011).

Estudos indicam a frequente associação da espécie de *Candida albicans* à estomatite protética, mas também apontam o envolvimento da *Candida glabrata* com o desenvolvimento dessa patologia, particularmente quando em combinação com a *Candida albicans* (Luo, Samaranayake, 2002; Coco et al., 2008; Pereira-Cenci et al. 2008a).

Por mais que espécies do gênero *Candida* sejam identificadas como principais patógenos da estomatite protética, o biofilme oral trata-se de um biofilme multiespécies e as bactérias constituem sua maior parte, coexistindo com as leveduras na cavidade oral (Nikawa et al., 1999; Kagermeier-Callaway et al., 2000; Pereira-Cenci et al., 2008; Marsh, 2010). A interação entre espécies diferentes de microrganismos em um mesmo biofilme pode alterar seu comportamento, sua capacidade de adesão a mucosa e superfícies da prótese, bem como a sua susceptibilidade à ação antimicrobiana de agentes de limpeza (Nikawa et al., 1999; Monroy et al., 2005; Pereira-Cenci et al., 2008a; Sesma, Marimoto, 2011; Marsh, Head, Devine, 2015; Allison et al., 2016; Cavalcanti et al. 2016).

Devido à grande associação de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* com espécies *Candida* encontrada no biofilme oral (Drake, Wells, Ettinger, 1992; Kagermeier-Callaway et al., 2000; Shay, 2000; Monroy et al., 2005; Pereira-Cenci et al., 2008a; Takahashi, Nyvad, 2011; Allison et al., 2016) é interessante a investigação desses microrganismos associados. Estudos que incluem microrganismos prevalentes na cavidade oral em um mesmo biofilme, tendem a reproduzir melhor as condições encontradas na boca (Nikawa et al., 1999; Pereira-Cenci et al. 2008b; Paranhos et al., 2009; Coimbra, 2016).

A higienização das próteses pode ser feita por meio do método mecânico, químico ou combinado (Budtz-Jorgensen, 1979; Abelson, 1981; Council on Dental Materials, Instruments and Equipments, 1983; Paranhos, Malachias, Pardini, 1991; Jagger, Harrison, 1995; Nikawa et al. 1999; Gonçalves et al., 2011).

O método mecânico consiste na limpeza por meio do uso de ultrassom ou por meio da escovação da prótese, com auxílio de escovas e agente auxiliar, como sabão ou dentífrico, e é o mais frequentemente utilizado (Silva-Lovato et al., 2006; Peracini et al. 2010; Felton et al., 2011). É considerado simples, acessível e efetivo (Budtz-Jorgensen, 1979; Paranhos et al., 2007a; Andrade et al. 2012,). Porém há de se considerar a diminuição da destreza manual e da acuidade visual dos idosos,

além do desenho da PPR, que podem tornar a aplicação desse método dificultada (Sesma, Marimoto, 2011).

O método químico é realizado por meio de imersão do aparelho protético em soluções que contêm solventes, detergentes, agentes antibacterianos e antifúngicos (Peracini et al. 2010). Classificados de acordo com sua composição e mecanismo de ação, os agentes químicos podem ser: hipocloritos, peróxidos, ácidos, agentes desinfetantes e drogas brutas (Budtz-Jorgensen, 1979; Nikawa et al., 1999; Shay, 2000; Sheen, Harrison, 2000).

Segundo a literatura, o método combinado, ou seja, mecânico associado ao químico, apresenta resultados melhores do que os obtidos com os outros métodos de forma isolada (Paranhos et al., 2007a; Gonçalves et al. 2011). A solução química utilizada deve ser capaz de eliminar os resíduos orgânicos e inorgânicos, sem alterar a superfície ou características físico-químicas de todos os materiais que compõem uma prótese, ter baixo custo e ser de fácil manipulação (Abere, 1979; Budtz-Jorgensen, 1979; Jagger; Harrison, 1995; Felton et al., 2011; Gonçalves et al., 2011).

A PPR é constituída de resina acrílica e estrutura metálica, comumente confeccionada a partir da liga metálica de cobalto cromo (Co-Cr). Tal fato dificulta o estabelecimento de um protocolo de higienização eficiente e seguro, pois ambos os materiais são suscetíveis à adesão de bactérias e leveduras (Shay, 2000). A indicação de agentes de higienização deve considerar a ocorrência de efeitos adversos aos componentes do aparelho protético (Backenstone, Wells, 1977; Paranhos et al., 2014). A alteração da superfície dos materiais pode causar aumento da porosidade, o que propicia maior retenção mecânica de resíduos, contribuindo para a formação do biofilme subsequente (Nikawa et al., 2003; Sesma, Marimoto, 2011; Felton et al., 2011; Kiesow et al., 2016; Santos et al., 2016).

Os hipocloritos, frequentemente indicados na higienização de próteses totais, agem na matriz orgânica onde se forma o cálculo, sendo agentes bactericidas, fungicidas, de baixo custo (Silva, FC, et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Salles et al., 2015; Arruda et al., 2016; Kiesow et al., 2016). Porém há relatos de odor e sabor desagradáveis, alteração de cor da resina acrílica e oxidação dos componentes metálicos (Beckenstone, Wells, 1977; Abere, 1979; Shay, 2000; Felipucci et al., 2011a,b; Davi et al., 2012; Paranhos et al., 2014; Jeyapalan et al.,

2015; Kiesow et al., 2016; Arruda et al., 2016), que contraindicam seu uso para higienização de PPR.

Os ácidos também são contraindicados por causarem corrosão dos componentes metálicos (Budtz-Jorgensen, 1979).

Entre os agentes desinfetantes, os enxaguatórios bucais são populares, devido ao seu sabor agradável e refrescante (Andrade et al., 2011; André et al., 2011; Paranhos et al., 2014). O cloreto de cetilpiridínio trata-se de um composto de amônio quaternário capaz de interagir com a membrana celular bacteriana, com amplo espectro de ação (Screenivasan et al., 2012), resultando na perda de componentes celulares, alteração do metabolismo, inibição do crescimento e consequente morte celular (Alves et al., 2012). Watanabe et al. (2008) concluíram que seus efeitos podem ser potencializados por substâncias como própolis, malva, eucaliptol, romã e juá.

Os peróxidos estão disponíveis comercialmente na forma de pó ou pastilhas e agem por meio da liberação de oxigênio. Não apresentam as mesmas desvantagens que o hipoclorito quanto ao odor e sabor. Entretanto, possuem alto custo e efeitos deletérios sobre a liga metálica podem ocorrer, resultantes do contato entre o metal e o cloro ou oxigênio, presentes em algumas marcas comerciais (Backenstone, Wells, 1977; Abere, 1979; Budtz-Jorgensen, 1979; Jagger, Harrison, 1995; Peracini et al., 2010b; Paranhos et al., 2014).

Os produtos à base de peróxidos apresentam contradições na literatura quanto à efetividade. Alguns estudos demonstram ineficácia quanto à sua ação antimicrobiana (Sesma et al., 1999; Silva, FC, et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Lee et al., 2009; Peracini, 2012), porém outros concluem que seu uso é eficaz na desinfecção e controle da deposição do biofilme oral (Budtz-Jorgensen, 1979; Drake et al., 1992; Andrade et al., 2011; Lee et al., 2011; Lucena-Ferreira et al., 2013; Andrade et al., 2014; Lucena-Ferreira et al., 2014; Kiesow et al., 2016; Coimbra, 2016). Segundo Paranhos et al. (2009), o efeito antimicrobiano está relacionado aos microrganismos presentes no biofilme.

Diversas plantas possuem propriedades medicinais conhecidas e recursos têm sido direcionados em busca de maior conhecimento a fim de aprimorar suas aplicações clínicas, visto que representam alternativa de menor custo, maior acesso para a população em geral e de grande impacto no tratamento de doenças

de alta prevalência (Cowan et al., 1999; Nascimento et al., 2000; Newman et al., 2000; Filoche et al., 2005).

A solução extraída da *Ricinus communis*, popularmente conhecida como mamona, é classificada como droga bruta. É biocompatível e possui propriedades detergentes e antimicrobianas (Ferreira et al., 1999; Meneghin et al., 2006; Takano et al., 2007; Pinelli et al., 2013; Watanabe et al., 2013; Salles et al., 2015; Arruda et al., 2016). *Ricinus communis* é uma planta típica de climas tropicais, amplamente cultivada no Brasil, país onde é mais encontrada no mundo. Por meio da prensagem de suas sementes em seus frutos são produzidos o óleo e a torta da mamona (Audi et al., 2013).

Separado da torta, o óleo da mamona possui um surfactante capaz de danificar a parede celular de microrganismos patogênicos, resultando em perda do conteúdo citoplasmático e consequente morte celular, apresentando ação contra bactérias gram-positivas e leveduras (Pinelli et al., 2013), além de biocompatibilidade com tecidos orais (Leite et al., 2014).

O detergente à base de mamona tem sido estudado na Odontologia em forma de soluções e dentifrícios (Ferreira et al., 1999; Malheiros-Segundo, 2011; Leite et al., 2012; Pisani et al., 2012; Badaró, 2013; Pinelli et al., 2013; Salles et al., 2015; Andrade et al., 2014; Arruda et al., 2016). Considerando os efeitos adversos, a eficiência na remoção do biofilme e a ação antimicrobiana, ainda não existe consenso na literatura quanto à concentração ideal a ser usada (Arruda et al., 2016).

Diante da dificuldade para definir uma prática de higienização que possa ser executada de maneira simples e visando selecionar um princípio ativo que apresente especificidade em sua ação, sem deixar de ser biocompatível, principalmente no caso de PPRs, novas iniciativas são necessárias em busca de agentes disponíveis que viabilizem higienização adequada e segura quanto à sua indicação.

Assim, de forma a contribuir com informações a respeito de soluções que poderiam ser utilizadas para higienização de PPRs, esse estudo foi desenvolvido para avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana de soluções de *Ricinus communis* 2% e 10%, Cepacol e NitrAdine em superfícies de Co-Cr, contaminadas com *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, de forma

isolada e em biofilme multiespécies.

A hipótese nula deste trabalho é que as soluções avaliadas não apresentariam diferença na ação antimicrobiana, em relação aos biofilmes selecionados para o estudo, em liga de Co-Cr.

2. Revisão de literatura

Dills et al. (1988) realizaram dois ensaios clínicos com produtos disponíveis no mercado (dentifrício e peróxido alcalino) para higienização de próteses a fim de avaliar a capacidade de reduzir os níveis de viabilidade de bactérias recuperadas do biofilme de próteses desenvolvidos *in vivo*. Os produtos foram utilizados seguindo recomendações do fabricante. No ensaio I, 14 usuários de PPRs foram selecionados para estudo *cross-over*, duplo cego e cruzado. Todas as próteses foram primeiramente higienizadas por meio de escovação com dentifrício e ultrassom. Os pacientes foram orientados a suspenderem qualquer tipo de higienização da prótese por 48 horas. No dia do tratamento os pacientes eram orientados a higienizar as próteses segundo o grupo: A) escovação (Dentu-Cream) por 30 segundos; B) imersão em peróxido alcalino (Efferdent) por 12 minutos a 45°C; C) escovação (Dentu-Cream) seguida por imersão em peróxido alcalino (Efferdent); D) sem tratamento. No ensaio II, 16 usuários de próteses totais maxilares participaram do estudo duplo cego e *cross-over*. O ensaio II seguiu os mesmos parâmetros do ensaio I, exceto por orientar os usuários a não higienizar a prótese por 72 horas antes do tratamento. As próteses foram enxaguadas em água corrente da torneira após o tratamento. Os resultados mostraram que imergir a prótese em peróxido alcalino causou redução maior dos microrganismos do que a escovação com dentifrício. A combinação de escovação e imersão não apresentou resultados melhores do que somente a imersão. Além disso, apenas a escovação não removeu mais microrganismos do que o grupo sem tratamento. O peróxido alcalino apresentou ação antimicrobiana sobre: *Fusobacterium spp.*, *Streptococci*, *Veillonella spp.*, assim como a quantidade total de microrganismos recuperados da prótese. Concluíram que os resultados suportam a necessidade de um higienizador em associação à escovação da prótese para obtenção de higienização adequada.

Drake et al. (1992) avaliaram a eficácia de higienizadores de imersão de prótese em reduzir UFC/mL de *C. albicans* e *S. mutans*. Foram utilizados corpos de prova retangulares (15 x 25 mm) obtidos a partir da base de resina acrílica de próteses. Os microrganismos foram semeados em Sabouraud a 37°C, em condições aeróbicas durante 24 horas e em TSB-YE (5% de CO₂) a 37°C durante 24 horas, respectivamente. Os espécimes foram contaminados e higienizados segundo a divisão nos grupos: 1) Pastilha efervescente à base de peróxido alcalino (Efferdent -12 minutos), 2) Pastilha efervescente à base de peróxido alcalino (Polident -12

minutos). Após imersão, foram lavados em água destilada estéril. Amostras das superfícies foram colocadas em PBS estéril e sonificadas por 10 segundos, para semear as diluições em Agar TS20B (5% de CO₂) por 48 horas e em Agar Sabouraud, em condições aeróbicas, por 24 horas. Os resultados mostraram que tanto o Efferdent, como o Polident, reduziram a aderência de *S. mutans*. Os dois higienizadores foram ineficazes contra *C. albicans*.

Taylor et al. (1998) compararam a retenção de *Streptococcus oralis*, *Actinomyces viscosus*, e *Candida albicans* em resina acrílica e em ligas de Co-Cr polidas, jateadas (com óxido de alumínio de baixa e alta granulação) e com banho de eletrobrilho, a fim de analisar o efeito do acabamento na subsequente contaminação por microrganismos. As suspensões de células foram padronizadas e incubadas com os materiais de teste durante uma hora a 37°C. Em seguida, as células foram contadas por meio de análise de imagem. A retenção de células bacterianas foi substancial (*S. oralis* 12% a 20% e *A. viscosus* 9% a 16%), independentemente do acabamento de superfície. Retenção máxima foi observada nas ligas de Co-Cr que haviam sido submetidas ao jateamento com baixa granulação e eletrobrilho. O aumento na rugosidade da superfície resultou em maior retenção de *C. albicans* (3% a 9%). Concluiu-se que o tamanho das células e o tipo de rugosidade afetaram a retenção de microrganismos nas superfícies.

Ito et al. (1999) determinaram a diluição inibitória máxima (DIM) de detergentes derivados do óleo de mamona (B-RL 20 e B-RL 50) em relação a oito cepas de cocos gram positivos, quatro de bacilos gram negativos e uma de levedura. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* e *Enterobacter agglomerans* não foram inibidos por ambos os detergentes. A DIM para *Candida albicans* foi 80 e 40 para B-RL 20 e B-RL 50, respectivamente, enquanto que, para os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, foi de 1280 para ambos. Para os cocos gram positivos *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, a DIM foi de 40 para o detergente B-RL 20; e de 20 para o B-RL 50. Concluíram que o detergente derivado do óleo de mamona não tem ação sobre gram negativos, mas apresenta ação antimicrobiana contra gram positivos e leveduras, podendo ser utilizado como antisséptico ou desinfetante.

Nikawa et al. (1999) revisaram mais de 20 artigos que analisaram a eficácia de higienizadores de prótese e evidenciaram as vantagens e as desvantagens de cada método. Os resultados obtidos variaram com o método, particularmente entre os testes *in vitro* e *in vivo*. Além disso, apontaram que os higienizadores químicos de prótese não são tão eficazes no uso clínico como nos testes *in vitro*. A eficácia duvidosa poderia estar relacionada à falta de padronização das metodologias e ao relato de resultados conflitantes. Os autores afirmaram que a padronização da metodologia deveria incluir a avaliação da eficácia dos higienizadores por meio dos dois métodos, testes *in vivo* e *in vitro*. Sugeriram a utilização de métodos e/ou meios que não só qualificassem, mas também quantificassem o biofilme.

Keyf e Gungor (2003) analisaram se o uso de hipoclorito de sódio (53%) e Corega Tabs poderiam causar efeitos deletérios sobre a superfície de uma liga metálica de Co-Cr para PPR. Foram confeccionados 19 corpos de prova, divididos em três grupos: água de torneira (controle) (n=6), Corega Tabs (n=6) e Axion (clareador à base de hipoclorito de sódio) (n=7). A massa dos corpos de prova foi mensurada e os corpos de prova foram imersos, em soluções preparadas conforme instruções dos fabricantes e trocadas de 12 em 12 horas. Cada corpo de prova foi imerso durante 30 minutos por dia na solução, por um período de 30 dias. As amostras foram analisadas em relação à reflectância com um espectrofotômetro, para verificação de alterações na superfície com um microscópio de luz e de análise da massa, antes e após o tratamento. Concluíram que soluções de limpeza à base de peróxido e hipoclorito de sódio apresentaram efeitos na superfície da liga de Co-Cr, como descoloração (perda de brilho) e manchamento, porém a massa dos corpos de prova foi mantida. Corega Tabs afetou a reflectância da superfície, mas o efeito foi menos significativo que o hipoclorito de sódio. A massa das amostras não foi alterada. Foi ressaltado que o Corega Tabs poderia ser utilizado com segurança.

Albuquerque et al. (2004) analisaram o efeito de um procedimento único de enxague bucal, por 30 segundos, com clorexidina a 0,12%, sobre a quantidade de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Staphylococcus aureus* na saliva, por meio de contagem de UFC, em 60 pacientes que necessitavam de cirurgia oral menor. Também foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) da clorexidina a 0,12%, e do cloreto de cetilpiridínio 0,05% frente a 25 cepas isoladas

dos microrganismos, por meio de diluição sequencial dos antissépticos. A saliva dos pacientes foi coletada antes e depois e semeada em meio específico. *S. aureus*, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram inicialmente detectados em 45%, 63% e 28% dos pacientes, respectivamente. Após o enxágue com clorexidina, as reduções de UFC foram em torno de 99% para todos os microrganismos. Todos os microrganismos foram inibidos a uma diluição de 1/20 e 1/80 de cloreto de cetilpiridínio e clorexidina, respectivamente.

Paranhos et al. (2007a) estudaram o efeito dos métodos mecânicos e químicos na quantificação do biofilme na superfície interna de próteses. O estudo selecionou portadores de próteses há mais de um ano e com acúmulo de biofilme na superfície interna destas. Os pacientes foram instruídos a limpar a prótese por 7 dias, segundo os métodos: 1- (grupo controle): lavagem da prótese com água após as refeições e sua imersão durante a noite em água; 2- Químico: lavagem da prótese com água após o café e almoço e sua imersão em solução de peróxido alcalino (Bonyplus) por 5 min após o jantar; 3- Mecânico I: escovação da prótese três vezes ao dia com escova dental macia (Johnson & Johnson) e dentifrício (Dentu Creme) durante 2 min; 4- Combinação I: combinação entre o método 2 e 3; 5- Mecânico II: similar ao método 3, porém com uma escova de dente da marca Oral B com cerda macia; 6- Combinação II: combinação entre os métodos 2 e 5. Os voluntários executaram todos os métodos de higienização aleatoriamente. As próteses foram fotografadas antes e após cada método para avaliar a redução de biofilme, em porcentagem. Todos os métodos testados diminuíram a quantidade de biofilme após o término do estudo. O grupo controle apresentou menor redução de biofilme que os demais métodos. Os métodos 3 e 5, e o métodos 4 e 6, foram igualmente eficazes e melhores que o método 2. Os autores concluíram que o método mecânico (escovação) ou a combinação deste com um método químico de higienização foram os mais eficazes para a higienização das próteses.

Paranhos et al. (2007b) avaliaram o efeito de seis métodos de higienização na quantidade de biofilme presente na superfície interna da Prótese Total após a utilização. Trinta e cinco voluntários utilizaram os seguintes métodos de higienização: (1) (Controle) enxaguar com água da torneira após as refeições (café da manhã, almoço e jantar) e imersão durante a noite; (2) química: enxaguar com água da torneira após o café da manhã e almoço e imersão em solução de peróxido

alcalino (Bonyplus) por 5 min depois do jantar; enxaguar a prótese com água antes da inserção na cavidade oral; (3) Mecânica I: escovar três vezes ao dia após as refeições usando escova de dentes macia (Johnson and Johnson's) e dentífrico específico para PTs (Dentu Creme), durante a noite as próteses ficam imersas em água; (4) Combinação I: Combinação dos métodos 2 e 3; (5) Mecânica II: Semelhante ao método 3, com exceção que foi utilizada outra escova de dentes com cerdas macias que foi usada (Oral B, nº. 40) (6) Combinação II: Combinação dos métodos 2 e 5. Aleatoriamente, todos os usuários executaram todos os métodos. Cada método foi utilizado por 21 dias. O biofilme foi evidenciado e quantificado por meio de fotografias digitais obtidas a partir da superfície interna. Os seis métodos apresentaram diferenças significativas no percentual de cobertura do biofilme. O Método 1 apresentou os maiores valores, 2 foi intermediário e outros resultados foram os mais baixos. O método mais eficaz foi o 6 (método mecânico associado ao químico). De acordo com os autores, o biofilme tende a acumular-se predominantemente em zonas específicas da base da prótese e este padrão não se alterou, independentemente do método utilizado. Concluíram que o efeito da remoção do biofilme por escovação foi mais eficaz do que a solução de peróxido alcalino testada. Além disso, a combinação de ambos os métodos promoveu obtenção de melhores resultados para a higienização das próteses totais.

Silva, FC, et al. (2008) avaliaram a capacidade de seis higienizadores de próteses (hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina a 2%, glutaraldeído a 2%, vinagre a 100%, pastilhas efervescentes à base de perborato de sódio e perborato de sódio a 3,8%) quanto à desinfecção superficial de resina acrílica. Espécimes contaminados, por *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus*, *E. colie* e *B. subtilis*, por meio da contagem das UFC, mas não submetidos à desinfecção compunham o controle. Após incubação, os espécimes foram imersos nas soluções higienizadoras por 10 minutos e posteriormente em solução salina para desprendimento das células fracamente aderidas. A solução resultante foi diluída seriadamente e semeada em meios específicos. O número de Unidades Formadoras de Colônias foi contado. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio a 1%, a clorexidina a 2% e o glutaraldeído a 2% foram os métodos mais eficazes contra todos os microrganismos testados, seguidos pelo vinagre a 100%, o perborato de sódio a 3,8% e as pastilhas efervescentes à base de perborato de sódio. O

perborato de sódio a 3,8% foi mais efetivo que as pastilhas efervescentes à base de peróxido tanto em relação a *Candida albicans* como *Streptococcus mutans*. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio a 1%, o glutaraldeído a 2%, a clorexidina a 2% e o perborato de sódio a 3,8% consistiam em alternativas válidas para a desinfecção da resina acrílica.

Watanabe et al. em 2008, realizaram estudos comparativos da eficiência de diferentes diluições dos enxaguatórios à base de cloreto de cetilpiridínio na eliminação de *Staphylococcus aureus*. Para determinar a máxima diluição inibitória (MDI) de quatro enxaguatórios bucais com cloreto de cetilpiridínio (CPC): CPC+própolis, CPC+malva, CPC+eucaliptol+juá+romã+própolis e CPC (Cepacol) contra 28 cepas de *S. aureus* foi utilizado o método de diluição em ágar. Para as leituras, a MID foi considerada a máxima diluição ainda capaz de inibir o crescimento microbiano. A partir dos resultados, foi possível concluir que os enxaguatórios à base de cloreto de cetilpiridínio demonstraram ação antimicrobiana e a adição de outras substâncias como própolis, malva, eucaliptol, romã e juá, potencializam o efeito antimicrobiano.

Ferreira et al. (2009) estudaram o efeito de higienizadores de próteses na aderência de *C. albicans* e *C. glabrata* em condicionadores de tecido. Após a contaminação, os espécimes foram imersos nos seguintes higienizadores: A) perborato de sódio Polident - 3 minutos; B) perborato de sódio Efferdent - 15 minutos e C) hipoclorito de sódio a 0,5% - 10 minutos. Os espécimes do grupo controle foram imersos em água destilada por 15 minutos. O número de células remanescentes após o tratamento foi observado com o auxílio de microscopia óptica. Os produtos Polident e Efferdent não foram eficazes na prevenção da aderência inicial de *Candida spp.* em condicionadores de tecido; já o hipoclorito de sódio apresentou significativa efetividade quando comparado aos outros grupos.

Lee et al. (2009) analisaram a eficácia de higienizadores em eliminar biofilmes planctônicos, aderidos em diferentes estágios de maturação, de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA-15 e MRSA-16) em corpos de prova de resina acrílica. Foram empregados três higienizadores: Solução de hipoclorito de sódio a 2% (Solução de Milton); Solução desinfetante 2% isenta de aldeído e com liberação de oxigênio (Perform) e Solução 1,5% de solução de peróxido alcalino (Steradent). Inicialmente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima dos agentes

antimicrobianos. O biofilme foi formado sobre espécimes de resina acrílica (Rapid Repair) com o auxílio de um dispositivo de formação de biofilmes. Foram analisados os biofilmes de quatro fases: planctônico, sésil (4 horas), estabelecido (24 horas) e maduro (120 horas). Os espécimes foram retirados após 4, 24 e 120 horas de formação de biofilme e imersos em cada agente antimicrobiano ou em solução salina (controle) por 1, 5 ou 10 minutos. Em seguida colocados em solução tampão e agitado por um minuto para obtenção das diluições seriadas, as quais foram semeadas e incubadas por 24 horas. Após esse período, as colônias foram contadas e a porcentagem de células viáveis calculada. As amostras também foram preparadas para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura. Os resultados da CIM mostraram que o NaOCl foi o mais efetivo com CIM de 0,03%, Perform com 0,12% e Steradent com 0,38% (MRSA-16) e 0,09% (MRSA-15). Os higienizadores foram efetivos contra MRSA em biofilme de 4 horas, com o hipoclorito a 2% sendo efetivo com exposição de 1 minuto. Os biofilmes de 24 e 120 horas foram mais resistentes à ação dos higienizadores, com o Steradent e Perform sendo menos eficazes; porém, o hipoclorito a 2% apresentou efetividade com apenas 1 minuto de imersão para todos os biofilmes formados. O Steradent foi o higienizador menos eficaz. Os autores concluíram que os biofilmes de MRSA (120 horas) são difíceis de erradicar, e que o único higienizador capaz de erradicar todos os biofilmes de MRSA-15 e 16 foi o hipoclorito a 2%. Os autores salientaram que a ausência ou inadequada higienização podem ser prejudiciais à saúde do paciente, pois podem ser fonte de reinfecção, principalmente em pacientes idosos e hospitalizados.

Paranhos et al. (2009) compararam três métodos de higienização de próteses totais (químico, mecânico e associado) e suas ações sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*. Duzentos e vinte corpos de prova de resina acrílica esterilizados com óxido de etileno foram contaminados com suspensão microbiana a 10^6 UFC/mL. Aleatoriamente, os espécimes foram distribuídos nos grupos: 1) Método químico: imersão em container com 200 mL de água destilada a 37°C e um tablete efervescente de peróxido alcalino (Bonyplus) durante 5 minutos; 2) Método mecânico: escovação com escovas dentais de cerdas macias (TEK – Johnson & Johnson) e dentifrício para dentadura (Dentu Creme) por 20 segundos, e posterior imersão em água

destilada durante 5 minutos; 3) Método associado: higienização pelo método mecânico e, em seguida, pelo método químico; 4) Controle Negativo: sem contaminação e posterior imersão em água destilada e esterilizada (200 mL) durante 5 minutos e 5) Controle positivo: contaminação e posterior imersão em água destilada e esterilizada (200 mL) durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os métodos para as cepas de *S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Já para *E. faecalis*, *C. albicans* e *C. glabrata* houve efetividade dos métodos mecânico e combinado. Para *E. coli* e *C. tropicalis*, a combinação dos métodos foi mais eficaz que o método mecânico. O método combinado apresentou resultados semelhantes ao método mecânico e foi mais efetivo que o químico na maioria das espécies avaliadas (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*). Com base nos resultados, os autores concluíram que a eficácia de cada um dos métodos de higienização testados variava de acordo com o biofilme microbiano.

Borges et al. (2010) testaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais (Periogard, Cepacol, Plax Classic e Oral-B) com e sem álcool frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Quarenta placas de Petri foram utilizadas para análise dos halos de inibição, por um único examinador calibrado. Os resultados mostraram que o Periogard, com e sem álcool, apresentou resultados mais satisfatórios. Plax sem álcool apresentou os piores resultados. Plax com álcool foi a melhor solução contra *S. aureus*. Os autores concluíram que os enxaguatórios sem álcool não apresentaram a mesma eficácia antimicrobiana que os que o continham em relação às cepas analisadas.

Li et al. (2010) estudaram a eficiência de um higienizador (Polident) em biofilmes específicos de *C. albicans* e *S. mutans*, e biofilme misto proveniente de saliva humana, com e sem adição de *C. albicans*, sobre corpos de prova de hidroxiapatita, resina acrílica, poliestireno e cerâmica, todos em forma de disco. Os corpos de prova foram esterilizados e inoculados com os biofilmes em um período de 20 horas. Os autores também verificaram se os diferentes materiais proporcionaram biofilmes diferentes de um mesmo microrganismo. Foi verificado que para *S. mutans* a biomassa foi similar nos diferentes materiais, porém na hidroxiapatita com aspecto diferente dos demais materiais, com compactação

maior de colônias. *C. albicans* apresentou menor aderência e biomassa em hidroxiapatita, sendo similar em outros materiais. Os biofilmes provenientes de saliva, independente da adição de *C. albicans*, apresentaram maior adesão e biomassa em hidroxiapatita do que nos outros materiais, que foram similares. Os resultados da ação antimicrobiana, obtidos por meio de leitura de UFC, indicaram que um mesmo microrganismo foi afetado de forma diferente pelo higienizador dependendo do material. Para *S. mutans* e *C. albicans* houve leitura zero para o poliestireno, sendo que na hidroxiapatita não verificaram diferença significativa para *C. albicans*, havendo redução significativa deste microrganismo em resina acrílica e cerâmica. Para *S. mutans* também houve redução significativa nos demais materiais. Para o biofilme salivar sem adição de levedura verificaram UFC zero em resina acrílica e redução significativa nos demais materiais. No biofilme salivar com adição de *C. albicans* fizeram leituras de microrganismos totais e isolados para *C. albicans*, e verificaram que não houve redução significativa de *C. albicans* em hidroxiapatita, assim como obtiveram leitura zero em poliestireno; nos demais materiais foi verificada redução significativa da *C. albicans* isolada no biofilme misto. A verificação de microrganismos totais apresentou leitura zero em cerâmica e redução significativa nos demais materiais. Concluiu-se que o material onde se desenvolve o biofilme afeta sua formação e a ação de agentes antimicrobianos.

Uludamar et al. (2010) avaliaram três pastilhas efervescentes higienizadoras de prótese (Polident, Efferdent e Fittydent) e dois enxaguatórios bucais (CloSYS II - clorexidina a 2% e Corsodyl - dióxido de cloro) quanto ao potencial de eliminação de *Candida albicans* no biofilme de próteses totais. Noventa usuários de próteses totais, com sinais clínicos de estomatite protética, foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (5 grupos experimentais e 1 controle). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, em que as próteses eram submetidas a 15, 30 e 60 minutos de desinfecção. As próteses do grupo controle foram tratadas com água destilada. em todos os períodos de tempo testados, os enxaguatórios promoveram redução significativamente maior de *Candida albicans* que o grupo controle. Além disso, em todos os períodos de tratamento testados, não houve diferença estatisticamente significante entre Polident, Efferdent e controle. As próteses tratadas com Fittydent somente apresentaram redução significativa do número de *Candida spp* após 60 minutos. Concluiu-se que o uso de

enxaguatórios reduz significativamente o número de microrganismos do biofilme de próteses totais.

Silva-Lovato et al. (2010) analisaram a eficácia do NitrAdine quanto à remoção de biofilme e ação antimicrobiana em próteses totais. Quarenta usuários de prótese total foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos e orientados a higienizar suas próteses, segundo os seguintes métodos: A) escovação (controle) – 3 vezes ao dia, após as refeições, com escova para dentadura e água; B) escovação e imersão (experimental) – 3 vezes ao dia, após as refeições, com escova para dentadura e água e C) imersão da prótese em NitrAdine. Cada método foi utilizado por 21 dias. O biofilme da superfície interna das próteses foi corado, fotografado e quantificado. A avaliação microbiológica foi conduzida para quantificar *Candida spp.* Observou-se que o NitrAdine reduziu a quantidade de biofilme e número de colônias de leveduras nas próteses em comparação com o grupo controle. Os autores concluíram que o uso de pastilhas higienizadoras pode ser recomendado como protocolo de higienização rotineira em próteses totais, para prevenir o desenvolvimento de biofilme microbiano indutor de estomatite protética.

Andrade et al. (2011) avaliaram o potencial antimicrobiano de pastilhas efervescentes e ultrassom em relação a *Candida spp.* e *Streptococcus mutans* em biofilme de próteses totais. Setenta e sete usuários de prótese total foram randomizados quanto à higienização da prótese, em quatro grupos: A) escovação com água (controle); B) imersão em pastilhas efervescentes (Corega Tabs); C) Uso de Ultrassom e D) Imersão em pastilhas efervescentes e uso de ultrassom. Todos os grupos realizaram escovação com escova específica e água, três vezes ao dia, antes de executar os tratamentos. O biofilme foi coletado antes do tratamento e após 21 dias. As amostras foram coletadas através de escovação da prótese com solução salina e os microrganismos foram quantificados por semeadura e contagem de UFC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos. Quantidades menores de UFC de *S. mutans* foram encontradas após utilizados o método B e D quando comparados aos outros métodos. O método B proporcionou menor quantidade de microrganismos aeróbios do que A, enquanto C e D mostraram resultados intermediários. Os autores concluíram que as pastilhas efervescentes diminuíram significativamente *S. mutans* e o total de aeróbios do biofilme da prótese. No entanto, nenhum método foi efetivo em

relação à *C. albicans*. O ultrassom apresentou efeito antimicrobiano discreto e menos efetivo que as pastilhas efervescentes para higienização de próteses totais.

André et al. (2011) analisaram a incidência de *Streptococcus mutans* (forma séssil) em próteses totais superiores após o uso de um dentifrício específico para higienização de próteses totais, bem como determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) e diluição inibitória máxima (DIM) de 3 enxaguatórios bucais: Cepacol, Plax e Periogard. Setenta e sete usuários de próteses totais foram distribuídos em 2 grupos: (A) grupo controle: dentifrício convencional (Kolynos Super Branco) e (B) grupo teste: dentifrício experimental para higienização de próteses. O biofilme das próteses foi coletado no início e após 90 e 180 dias dos tratamentos, por meio de escovação das próteses com solução salina. Após a diluição decimal seriada, as amostras foram semeadas em ágar sacarose bacitracina para a contagem de colônias características de *S. mutans*. A identificação de *S. mutans* foi realizada por meio de testes de fermentação de açúcares. Após este procedimento, o caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) foi adicionado aos antissépticos (Plax, Cepacol e Periogard) e semeado em placas de Petri. As colônias foram semeadas usando o mutiplicador de Steers e após a incubação, a concentração inibitória mínima e a concentração inibitória máxima dos enxaguatórios foram calculadas. Os resultados mostraram que a incidência de *Streptococcus mutans* nas 77 próteses totais examinadas foi de 74,0% (n=57), sendo 76,3% (n=29) do grupo controle (pasta convencional) e 71,8% (n=28) do grupo teste (dentifrício experimental). Em ambos os grupos, o número de casos positivos para *S. mutans* diminuiu, do início para 180 dias. Houve pequena diminuição da incidência de *S. mutans* após 90 dias do uso do dentifrício experimental, o que não foi observado no grupo controle. Com relação aos enxaguatórios, para ambos os grupos, Periogard apresentou atividade antimicrobiana com diluições maiores, seguido do Cepacol e Plax. Os autores concluíram que a incidência de *S. mutans* em próteses totais foi elevada e que o Periogard foi o enxaguatório com melhor ação antimicrobiana contra esses microrganismos. O dentifrício experimental apresentou pequena ação em relação ao *S. mutans* após 90 dias de tratamento.

Felipucci et al. (2011a) avaliaram liberação de íons e perda de massa em espécimes mistos de resina e metal na simulação de imersão por 180 dias em

soluções higienizadoras. Cinco corpos de provas de duas ligas metálicas de Co-Cr: DeguDent (DD), e VeraPDI (VPDI) foram confeccionados. Os corpos de provas eram constituídos por discos metálicos (12 mm x 3 mm), incluídos em tiras de resina acrílica (38 mm x 18 mm x 4 mm). Foram avaliados 7 higienizadores: Periogard (PE), Cepacol (CE), Corega Tabs (CT), Medical Interporous (MI), Polident (PO), Hipoclorito de sódio a 0,05% (NaOCl) e água destilada (AD), como controle. A quantidade de massa foi analisada antes e após as imersões. A liberação de íons foi analisada com a solução pura e após as imersões. Os autores verificaram que CT e MI apresentaram maiores valores em relação à perda de massa com alteração maior na liga VPDI quando comparada à liga DD. As soluções que causaram maior liberação de íons foram NaOCl e MI. Concluíram que o hipoclorito de sódio a 0,05% e o higienizador Medical Interporous não eram adequados como soluções químicas higienizadoras para PPR.

Felipucci et al. (2011b) avaliaram a ação de agentes de higienização na superfície dos materiais constituintes de uma PPR. Espécimes compostos por disco metálico (12 x 3 mm) centralizado em uma tira de resina (38 x 18 x 4 mm) (n=5). Duas ligas de Co-Cr (DeguDent e Vera PDI) e 6 soluções (Periogard, Cepacol, Corega Tabs, Medical Interporous, Polident e hipoclorito de sódio a 0,05%), além de água destilada (controle) foram utilizados. Um total de 70 espécimes foi empregado, simulando imersões de 180 dias. Análises da perda de massa em balança de alta precisão e da rugosidade superficial em rugosímetro foram efetuadas antes e após as imersões. Procederam às análises ópticas e qualitativas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDS). Verificaram visualmente o aparecimento de manchas nas superfícies metálicas no grupo do hipoclorito de sódio a 0,05% e Medical Interporous, assim como alterações superficiais visualizadas por meio das fotomicrografias e presença de oxigênio, visualizado por meio do EDS, sugerindo pontos de oxidação nas ligas metálicas. Não houve alteração da rugosidade pelas soluções tanto no metal, quanto na resina. Em relação à perda de massa, as soluções Corega Tabs e Medical Interporous, a liga Vera PDI apresentou os maiores valores. Por meio da MEV, pode-se verificar oxidação generalizada causada pelo hipoclorito de sódio e localizada ocasionada pelo Medical Interporous. Os autores

concluíram que o Cepacol, Periogard e Polident não apresentaram efeitos adversos, podendo ser usados como meios auxiliares à escovação de PPR.

Alves et al. (2012) revisaram pesquisas de metanálises e revisões sistemáticas nas bases primária Pubmed e secundária Cochrane, acerca do cloreto de cetilpiridínio. O objetivo foi determinar se este composto era eficaz na diminuição de biofilme e no controle do grau de inflamação gengival. Relataram que, apesar da evidência científica ser ainda escassa, a utilização de cloreto de cetilpiridínio como complemento às formas mecânicas de higienização oral, parece fornecer pequeno, mas significativo, benefício na redução de biofilme e da inflamação gengival, quando comparado com escovação ou escovação seguida de bochechos com placebo.

Peracini (2012) analisou o efeito de soluções higienizadoras quanto ao controle do biofilme. Trinta e dois usuários de próteses totais foram orientados a escovar suas próteses, por meio de escova (Denture) e sabonete líquido, três vezes ao dia e imergí-las, durante o período noturno, nas soluções: A) Controle: água natural; B) Peróxido alcalino (Corega Tabs) e C) Hipoclorito de sódio a 0,5%. Cada solução foi utilizada por 21 dias, ou seja, três ciclos de sete dias. Ao final de cada ciclo, a superfície interna da prótese total superior foi evidenciada com vermelho neutro a 1% e fotografada, para quantificação do biofilme corado por meio do software Image Tool 3.0. Os resultados mostraram que a imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% foi mais efetiva, pois promoveu remoção significativa do biofilme das próteses totais, quando comparado ao controle e à pastilha efervescente.

Pisani et al. (2012) estudaram a estabilidade de cor, dureza Shore A e rugosidade de reembasadores resilientes de diferentes marcas (Elite Soft Relining e Mucopren Soft), após imersão em diferentes soluções. Foram obtidos 30 espécimes de cada um dos reembasadores e distribuídos em três grupos, de acordo com a solução de imersão: água destilada, hipoclorito a 1% e solução de *Ricinus communis* a 2%. Os espécimes foram imersos em cada uma das soluções por sete dias, simulando 18 meses de imersões diárias de 20 minutos; por 15 dias, simulando três anos de uso diário de 20 minutos e 183 dias, simulando 18 meses de imersões diárias de oito horas. Após os períodos de imersão, o reembasador Elite Soft Relining apresentou maior alteração de cor que o Mucopren Soft e o Mucopren apresentou aumento da dureza em relação ao Elite Soft; maiores

alterações de cor foram causadas pelo hipoclorito. Ambos os materiais apresentaram maior estabilidade de cor após imersão em *Ricinus communis* 2%.

Badaró, em 2013, avaliou soluções higienizadoras à base de hipoclorito alcalino 0,25% e 0,5% e *Ricinus communis* 10% quanto aos seguintes aspectos: capacidade de remoção do biofilme de superfícies internas de próteses totais; influência na remissão de candidíase atrófica crônica e avaliação, por meio de questionário, da satisfação do paciente quanto à utilização. Sessenta e quatro usuários de prótese total com ausência (n=40) ou presença de candidíase (n=24) foram orientados a escovar as próteses com escova específica e sabão neutro por 3 minutos, 3 vezes ao dia e imergí-las nas soluções higienizadoras (Hipoclorito de sódio 0,25% - S1; e 0,5% - S2; *R. Communis* 10% - S3; Salina - S4: controle) durante 20 minutos, por 7 dias. As soluções foram utilizadas de forma cruzada e randomizada com intervalos de *wash out*. O biofilme foi quantificado por meio da evidenciação do biofilme das próteses e fotografia, que foi interpretada por software (*Image Tool 3.0*) ao final de cada período. A remissão da candidíase foi avaliada por atribuição de escores antes e após o uso das soluções. A satisfação dos pacientes foi analisada por questionário. Não houve diferença na porcentagem de biofilme entre pacientes com e sem inflamação, bem como na interação entre os fatores. Houve diferença entre soluções, sendo que o hipoclorito de sódio a 0,25 e 0,5% promoveu as menores médias de biofilme, seguido da solução de *R. communis* e salina. Para remissão da candidíase, as soluções mais eficientes foram *R. Communis* (50%) e hipoclorito de sódio 0,25% (46%). O questionário de satisfação não indicou diferença entre as soluções. Concluiu-se que há viabilidade do uso do hipoclorito de sódio em menores concentrações e do *Ricinus communis* 10% para remoção do biofilme e remissão da candidíase.

Lucena-Ferreira et al. (2013) investigaram se higienizadores de prótese reduzem a quantidade de microrganismos em biofilmes de PPRs. Vinte e cinco usuários de PPRs foram instruídos a complementar a higiene de suas próteses com imersão em peróxido alcalino (Polident) uma vez por dia, por 3 minutos, por um período de 15 dias. O biofilme coletado das superfícies das PPRs imediatamente antes, e depois das higienizações com um *swab* estéril, foi imerso em solução salina, agitado e semeado em meios específicos para quantificação de *Streptococcus spp.* e *Candida spp.* Foi observada redução de *Streptococcus spp.*, mas nenhuma diferença

foi observada em *Candida spp.* Os autores concluíram que o uso diário de higienizadores melhora a higiene das próteses, reduzindo o total de microrganismos e de *Streptococcus spp.* de PPRs, mas não apresenta ação contra *Candida spp.*

Paraniello (2013) estudou a eficácia da escovação e imersão em reduzir a viabilidade de biofilme multiespécies em resinas acrílicas. Amostras preparadas com Lucitone 550 (L) e Tokuyama Rebase Fast II (T) (n=12) inoculadas com suspensão de 10^7 células/mL de *Candida albicans* e *Candida glabrata* e de 10^8 células/mL de *Streptococcus mutans*, foram limpas por meio de escovação ou imersão durante 10 segundos nas soluções: água destilada (A); ácido peracético 0,2% (Ac), digluconato de clorexidina 1% (Chx), solução água/dentifrício 1:1 (D), hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) e perborato de sódio (Pb). Os microrganismos viáveis foram avaliados por ensaio de XTT e contagem de colônias (UFC/mL). A remoção do biofilme aumentou com escovação combinada com agentes químicos de limpeza. A imersão em Ac e NaOCl mostrou-se tão eficaz quanto a escovação em L e T.

Pinelli et al. (2013) analisaram a efetividade do *Ricinus communis* a 3,3% (RC), Nistatina (NIS) e Miconazol (MIC) no tratamento de idosos institucionalizados com estomatite protética. Trinta idosos foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em três grupos: RC, NIS ou MIC. Avaliações clínicas e micológicas foram realizadas antes da utilização do antifúngico e repetidas depois de 15 e 30 dias de tratamento. A amostra foi clinicamente analisada em relação à condição da mucosa oral. Fotografias padronizadas foram tiradas do palato e a candidíase oral foi classificada de acordo com Critério de Newton. A investigação micológica foi realizada pela raspagem da mucosa palatal e a presença de *C. albicans* foi quantificada por meio da contagem do número de unidades de formação de colônias (CFU/mL⁻¹). Significativa melhora na aparência clínica da estomatite protética nos grupos MIC e RC foram observadas entre a primeira e a terceira coletas, o que se repetiu entre a segunda e a terceira coletas. Nenhum grupo demonstrou redução estatisticamente significativa de CFU/mL⁻¹ em momento algum. Embora nenhum dos tratamentos tenham diminuído o CFU/mL⁻¹, pode-se concluir que o *R. communis* a 3,3% pode melhorar a condição clínica da estomatite protética em pacientes idosos, mostrando resultados similares ao

Miconazol. Pode ser considerado alternativa de tratamento convencional viável para idosos.

Sreenivasan et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de dois enxaguatórios bucais disponíveis comercialmente, à base de cloreto de cetilpiridínio 0,05% (CPC) com e sem álcool, comparado à clorexidina e a um enxaguatório bucal fluoretado (sem CPC), usado como controle. Primeiramente, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para cada enxaguatório contra 25 cepas de bactérias, incluindo espécies comumente associadas a cárie, gengivite e periodontite. Posteriormente foi coletado biofilme supragengival de 15 adultos e incubado com os quatro enxaguatórios para avaliar a ação sobre biofilmes orais. Os dois enxaguatórios com CPC exibiram menores CIMs, ou seja, melhor ação antimicrobiana contra bactérias gram-negativas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Solobacterium moorei*, em comparação ao controle. As análises *ex vivo* mostraram resultados significativamente melhores quanto à atividade antimicrobiana dos enxaguatórios contendo CPC e clorexidina comparados ao controle. Conclui-se que enquanto a clorexidina foi mais efetiva, enxaguatórios contendo CPC com ou sem álcool demonstraram grande espectro antimicrobiano tanto contra as cepas laboratoriais, quanto contra o biofilme supragengival, comparados ao controle.

Watanabe et al. (2013) avaliaram, em um estudo *in vitro*, a atividade antibacteriana do detergente de óleo de mamona contra cepas hospitalares por meio da diluição em ágar - Diluição Inibitória Máxima (DIM). A atividade do detergente de óleo de mamona foi avaliada contra 60 cepas bacterianas isoladas de infecções de pacientes hospitalizados (30 *S. aureus* e 30 *Pseudomonas aeruginosa*). De acordo com a técnica de diluição em ágar, todas as cepas de *S. aureus* foram sensíveis ao detergente de óleo de mamona (DIM de 1/80), enquanto que as cepas de *P. aeruginosa* não foram inibidas. Concluiu-se que a atividade antibacteriana do detergente de óleo de mamona foi evidenciada apenas para as bactérias gram-positivas (*S. aureus*).

Andrade et al. (2014) estudaram a eficácia da solução de *Ricinus communis* 2% na remoção de biofilme de próteses totais, quando comparada às soluções de hipoclorito de sódio 1% e peróxido alcalino. Cinquenta e cinco desdentados totais

foram orientados a escovar a prótese após as refeições e imergí-las uma vez ao dia nas soluções: salina por 20 minutos, peróxido alcalino Polident por três minutos, hipoclorito de sódio a 1% e solução de *Ricinus communis* a 2%, por 20 minutos. Cada solução foi utilizada durante sete dias consecutivos, seguindo uma sequência randomizada. Após cada período de sete dias, a superfície interna da prótese total foi corada com vermelho neutro a 1% e fotografada, para quantificação do biofilme com software (Image Tool 3.0). Os resultados mostraram que as maiores e menores porcentagens de biofilme foram encontrados para a solução salina e hipoclorito de sódio 1%, respectivamente, enquanto Polident e a solução de *Ricinus communis* apresentaram resultados intermediários. Concluiu-se que a solução de hipoclorito de sódio 1% foi a mais efetiva e que a solução de *Ricinus communis* 2% apresentou efetividade semelhante aos peróxidos alcalinos.

Leite et al. (2014) analisaram a ação antimicrobiana de um dentifrício à base de mamona 10%, por meio de escovação de espécimes de resina acrílica contaminados com microrganismos patogênicos prevalentes na cavidade oral (*S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*). O ensaio de concentração inibitória mínima do ensaio foi realizada com *R. communis* em óleo puro a 2,5%. Apenas *E. coli* não foi inibida pelo *R. communis*, mas a concentração inibitória mínima (0.0781%) foi efetiva contra os outros microrganismos. A partir destes resultados foi determinada a concentração de *R. communis* para o dentifrício experimental, 1, 2, 5 e 10%, avaliadas pelo teste de difusão em Agar. Os dentifrícios Colgate, Trihydral e Corega Brite também foram testados. O diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano, foi medido com régua sob uma luz refletida. Nenhum dentifrício foi eficaz em relação à *E. coli*. Os dentifrícios experimentais contendo *R. communis* a 2, 5 e 10 % apresentaram ação contra *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecallis*. Os dentifrícios experimentais não mostraram atividade antimicrobiana contra *Candida spp* e *E. coli* em nenhuma das concentrações testadas. O Trihydral foi o mais eficaz. Comparando os dentifrícios experimentais, o *R. communis* a 10% produziu os maiores halos de inibição do crescimento microbiano e apresentou atividade antimicrobiana similar a dos dentifrícios comerciais, exceto contra *S aureus*. O dentifrício à base de mamona foi eficaz na redução de UFC de *S. aureus*, *S. mutans* e *E. faecalis*.

Andrade et al. (2014) estudaram a eficiência da solução à base de óleo de mamona 2% na remoção de biofilme em próteses totais e compararam com outras duas soluções higienizadoras amplamente utilizadas (hipoclorito de sódio a 1% e peróxido alcalino). Cinquenta usuários de prótese total foram orientados a escovar com escova e dentifrício específicos para prótese, três vezes por dia após as refeições, e utilizar os seguintes métodos químicos de imersão de prótese uma vez por dia: (após o jantar) soro fisiológico (controle), hipoclorito de sódio a 1%, solução de óleo de mamona 2% por 20 minutos cada e peróxido alcalino Polident por 3 minutos. Os participantes utilizaram cada solução por um período de sete dias consecutivos, de acordo com uma sequência aleatória. As superfícies internas das próteses foram coradas com vermelho neutro a 1%, fotografadas com câmera digital e o biofilme quantificado utilizando o *software* Image Tool 3.0. Houve diferença significativa entre as soluções. O soro fisiológico e o NaOCl foram significativamente diferentes, enquanto o Polident e a solução de mamona 2% apresentaram resultados intermediários. Concluíram que a solução de óleo de mamona 2% para imersão de curta duração foi comparável ao peróxido alcalino na remoção do biofilme.

Lucena-Ferreira et al. (2014) investigaram o efeito da exposição diária a um higienizador sobre biofilme multiespécies. Os corpos de prova de resina acrílica foram polidos de ambos os lados e a rugosidade de superfície padronizada ($0,32 \pm 0,03 \mu\text{m}$). A esterilização foi realizada com óxido de etileno. Um biofilme misto composto por seis microrganismos, sendo cinco bactérias (*Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*) e uma levedura (*Candida albicans*) foi desenvolvido. Todas as cepas foram cultivadas individualmente. Após 15 horas de incubação a 37°C, alíquotas destas pré- culturas foram transferidas para um novo tubo e incubadas a 37°C durante 7 horas. Após a maturação do biofilme, os corpos de prova foram distribuídos aleatoriamente em grupos controle (sem tratamento) e experimental. No grupo experimental, os corpos de prova foram submetidos a imersões diárias durante 3 minutos em um peróxido alcalino com enzima (Polident - 3 Minutos), durante sete dias consecutivos. Os corpos de prova foram lavados em solução salina, transferidos para tubos contendo 3 mL de solução salina e agitados em ultrassom. A suspensão resultante foi semeada em meios de cultura específicos. As análise

foram feitas nos dias 1, 4, e 7 pelo número de microrganismos e concentrações de polissacarídeos. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia confocal (MC) foram também realizadas. O estudo demonstrou que o total de microrganismos foi menor com uso do Polident, quando comparado ao grupo controle, para todos os períodos avaliados. No entanto, o número total de *C. albicans* aumentou em todos os biofilmes expostos ao higienizador, sendo identificadas hifas nas imagens do MEV E MC. A concentração de polissacarídeo foi significativamente maior no grupo experimental após 7 dias. Os autores concluíram que o uso diário de higienizador de dentadura reduz o número de microrganismos de biofilmes multiespécies.

Paranhos et al. (2014) analisaram a ação de higienizadores de prótese sobre a cor de resina acrílica termicamente ativada e brilho de ligas metálicas. Espécimes metálicos em forma de disco foram confeccionados em: I) titânio comercialmente puro (Tritan), II) níquel-cromo-molibdênio-titânio (Vi-Star), III) níquel-cromo-molibdênio (Fit Cast-SB Plus), IV) níquel-cromo-molibdênio-berílio (Fit Cast-V). Cada disco de metal foi incorporado à resina acrílica retangular. Os espécimes (n=5) foram imersos na seguintes soluções contendo: hipoclorito de sódio a 0,05%, Periogard, Cepacol, Corega Tabs, Medical Interporous, Polident e água (controle), simulando 180 imersões. A mensuração da cor da resina acrílica (ΔE) foi determinada por um colorímetro. O brilho superficial do metal foi examinado visualmente. Os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os grupos, mas não entre as soluções. A maior média de alteração de cor foi obtida pelo grupo III, seguido pelo grupo II. A menor alteração de cor foi obtida pelo grupo I e o IV. A mudança na cor dos grupos I, II, IV foi leve, mas perceptível, e a mudança de cor foi considerável no grupo III. A análise visual mostrou que o hipoclorito de sódio 0.05% causou mudanças de brilho no metal nos grupos II e IV. Concluíram que os agentes higienizadores apresentaram o mesmo efeito na cor da resina e que a maior alteração de cor ocorreu no grupo Fit Cast-SB. As ligas metálicas não foram resistentes à ação do hipoclorito de sódio 0,05%, especialmente as ligas de Ni-Cr.

Schwindling et al. (2014) realizaram revisão de literatura com o intuito de avaliar o efeito dos meios de higienização química em relação à rugosidade de superfície dos materiais de base da prótese total. Foram analisados 193 artigos,

entretanto, levando em consideração os critérios de inclusão e exclusão, e este número foi reduzido a 25, sendo apenas um estudo *in vivo*. Para cada agente desinfetante, foram encontrados estudos que relataram alteração de superfície após higienização química. Relataram que a literatura sugeria que as alterações na rugosidade estavam frequentemente associadas ao perborato de sódio e menos frequentemente ao digluconato de clorexidina e glutaraldeído. Uma vez que foram encontrados apenas estudos isolados para solução enzimática, etanol, ácido peracético, cloreto de cetilpiridínio e ácido cítrico. Os autores concluíram que a alteração física da superfície seria apenas um dos aspectos a ser considerado durante a decisão de qual higienizador químico utilizar. Sugeriram mais pesquisas para definir se realmente esses produtos poderiam ser indicados para usuários de próteses.

Salles et al. (2015) compararam a ação antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio (0,25% e 0,50%) e solução de mamona a 10% frente a microrganismos específicos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida glabrata*), por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Trezentos e vinte corpos de prova de resina acrílica (n=10), após contaminação, foram imersos em uma das soluções descritas: S1: Hipoclorito de sódio a 0,25%; S2: Hipoclorito de sódio a 0,5%; S3: Solução experimental à base de *Ricinus communis* a 10%; S4: Salina – Controle. Após o ensaio, as células aderidas foram suspensas e semeadas em meios específicos. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio (0,25% e 0,5%) eliminou completamente todos os microrganismos. A solução de mamona eliminou *B. Subtilis* e reduziu das outras espécies. Diferenças entre S3 e S4 foram significantes para todas as espécies, exceto para *E. faecalis*. Relataram que ambas as soluções de hipoclorito de sódio são efetivas e capazes de eliminar todos os microrganismos avaliados e podem ser utilizadas para controle do biofilme em próteses totais.

Watanabe et al. em 2015, compararam *in vitro* a máxima diluição inibitória (MDI) de 3 enxaguatórios bucais (Periogard, Cepacol, Plax Fresh Mint) A ação antimicrobiana foi avaliada em placas de culturas de células de 96 poços contra 36 cepas isoladas clinicamente de *S. mutans*. A MDI foi de 1/320 para Periogard e Cepacol, e 1/120 para Plax. Conclui-se que enxaguatórios contendo clorexidina

(Periogard) e cloreto de cetilpiridínio (Cepacol) apresentaram maiores atividades antimicrobianas *in vitro* contra *S. mutans* do que o antisséptico contendo triclosan (Plax).

Coimbra et al. (2016) avaliaram a ação antimicrobiana de higienizadores de dentaduras em espécimes de resina acrílica (n=360). Os espécimes foram contaminados com suspensões a concentração de 10^6 UFC/mL de *Candida albicans* (Ca), *Candida glabrata* (Cg), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Streptococcus mutans* (Sm), *Bacillus subtilis* (Bs), *Enterococcus faecalis* (Ef), *Escherichia coli* (Ec), and *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). Após 48 horas de incubação a 37°C os espécimes (n=10 por grupo) foram imersos em soluções higienizadoras, preparadas segundo orientações dos fabricantes: Grupo CP (controle positivo) solução tampão fosfato salino (PBS); Grupo MI, NitrAdine, Medical Interporous; Grupo EF, Efferdent Plus; Grupo CT, Corega Tabs; e Grupo NC (controle negativo; n= 5), sem contaminação e imerso em PBS. Após incubação (37°C, 24 horas) o número de colônias foi contado e calculado a quantidade de UFC/mL. Houve diferenças significativas entre os grupos avaliados. MI foi efetivo contra Ca, Cg, Sa, Sm, Ef, Ec e Pa; EF foi efetivo contra Cg, Sm, Ef, Ec e Pa; e CT foi efetivo contra Sa, Bs e Ec, quando comparados ao grupo CP. Conclui-se que o higienizador Medical Interporous foi o mais eficaz, apresentando ação antimicrobiana sobre os biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Sedrez-Porto et al. (2016) realizaram uma revisão de literatura, incluindo 25 estudos que avaliaram o uso de protocolos de limpeza para próteses removíveis através de questionários, ensaios clínicos, estudos clínicos randomizados e revisões sistemáticas. Os resultados demonstraram que a má preservação das próteses ocorre principalmente devido ao baixo conhecimento sobre os hábitos e métodos de limpeza. Concluíram que ainda não existe um protocolo padrão para todos os pacientes, devendo ser personalizado para cada um. Os autores destacaram a importância dos cirurgiões dentistas em dar instruções adequadas quanto a manutenção e higiene das próteses.

Kiesow et al. (2016) estudaram a ação antimicrobiana e a compatibilidade de materiais que compõem próteses dentárias em relação aos protocolos de higienização mais utilizados. Avaliaram a ação de pastilha para higienização de prótese (Polident Overnight Whitening), dentifrício (Colgate Toral), enxaguatório

bucal (Listerine Original), álcool isopropílico (IPA), hipoclorito de sódio 6%, sabão e vinagre. A integridade dos materiais constituintes da prótese, incluindo metacrilato de polimetila (PMMA) e liga metálica, foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura e perfilometria após protocolos laboratoriais de higienização simulando 2 anos de uso. Os tratamentos foram também avaliados em relação à ação antimicrobiana frente a microrganismos comumente encontrados na cavidade oral (*C. albicans*, *K. Pneumoniae*, *S. mutans*, *F. Nucleatum*, *P. gingivalis*). O enxaguatório e o IPA danificaram a superfície do PMMA e a escovação com dentífrico causou arranhões e perda de material. O hipoclorito de sódio causou corrosão na liga de Co-Cr. Pastilhas higienizadoras promoveram pequenos danos a quaisquer dos materiais. Vinagre e sabão foram compatíveis com todos os materiais. Em ensaios de ação antimicrobiana, o hipoclorito de sódio promoveu excelentes resultados. Diluições concentradas foram necessárias para IPA e enxaguatórios bucais serem eficazes. As pastilhas higienizadoras foram eficazes em relação a todos os microrganismos após 5 minutos de imersão. O dentífrico foi eficaz contra bactérias, mas não contra *Candida albicans*. Vinagre e sabão não apresentaram ação antimicrobiana. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio foi bastante eficaz na ação antimicrobiana, mas incompatível com componentes metálicos da prótese. O IPA e o enxaguatório bucal apresentaram ação antimicrobiana, mas danificaram o PMMA. As pastilhas de higienização de próteses proporcionaram satisfatória combinação entre ação antimicrobiana e compatibilidade do material.

Arruda et al., 2016, avaliaram a eficácia dos higienizadores de Prótese Total em termos de remoção de biofilme, ação antimicrobiana e remissão da estomatite dentária. Cinquenta portadores de dentaduras com estomatite dentária foram instruídos a escovar suas dentaduras (escova e (20 minutos / 14 dias) em 4 soluções, como se segue: C (controle), solução salina a 0,85%; SH1, hipoclorito de sódio a 0,1%; SH2, hipoclorito de sódio a 0,2% e RC, 8% *Ricinus communis*. O biofilme na superfície das dentaduras superiores foi corado, fotografado e quantificado por software (Image Tool). Foi depois recolhido (escovado com solução salina), e a suspensão obtida foi diluída (10^0 a 10^{-3}) e semeada (50 mL) em CHROMagar para *Candida spp*. Após incubação, foram calculadas as unidades formadoras de colónias por mililitro. A remissão da estomatite dentária

foi classificada segundo a classificação de Newton. Os dados foram analisados por Friedman ($A = 0,05$) e testes de Wilcoxon e teste de Bonnferroni($\alpha=0,005$). SH1 (RM=1,98) e SH2 (MR=1,64) apresentaram menor cobertura de biofilme que C (MR=3,73) semelhante à RC (MR = 2,92). SH1 (MR=2,43) e SH2 (MR=2,10) mostraram ação antimicrobiana para *Candida spp* e RC (MR=3,36) apresentaram resultados semelhantes aos de C (MR = 3,51) e Basal (MR=3,50). Os sinais clínicos de estomatite da prótese foram reduzidos por SH1 (MR=2,44), enquanto SH2 (MR=2,56) e RC (MR=2,74) mostraram resultados intermediários. Os autores concluíram que as duas soluções de hipoclorito de sódio foram os meios mais eficazes de controle de filme. Todas as soluções testadas foram eficazes na redução dos sinais de estomatite dentária.

Baseado no que foi relatado, verifica-se que ainda a literatura não apresenta um consenso a respeito da ação antimicrobiana de soluções higienizadoras sobre a superfície metálica de Co-Cr. Além disso, não existe um protocolo de higienização específico para PPR. Deste modo, há ainda necessidade de aprofundar os estudos em relação à essa ação antimicrobiana dos higienizadores químicos sobre a superfície metálica de Co-Cr, de forma a encontrar uma solução adequada para higienização de PPRs.

3. Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de ensaio de imersão *in vitro*, a ação antimicrobiana de soluções experimentais de *Ricinus communis* nas concentrações de 2% e 10%, peróxido alcalino e cloreto de cetilpiridínio sobre espécimes de Co-Cr contaminadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e todos os microrganismos incluídos em um mesmo biofilme.

4. Material e método

4.1. Delineamento experimental

Com a finalidade de verificar a ação antimicrobiana das soluções higienizadoras, foram definidos dois fatores de variação para o estudo (Figura 1).

- **Microorganismos (M)**, em cinco níveis:

1. *Streptococcus mutans*;
2. *Staphylococcus aureus*;
3. *Candida albicans*;
4. *Candida glabrata*;
5. Biofilme misto (*Streptococcus mutans*; *Staphylococcus aureus*; *Candida albicans* e *Candida glabrata*)

- **Soluções auxiliares de higienização (S)**, em cinco níveis (Figura 2):

1. *Ricinus communis* 2%;
2. *Ricinus communis* 10%;
3. Peróxido alcalino (NitrAdine) (Tabela 1);
4. Cloreto de cetilpiridínio 0,500 mg (Cepacol) (Tabela 1);
5. Água destilada (controle).

Três espécimes por grupo de biofilme foram submetidos a todas as etapas, exceto à inoculação de microrganismos e imersão em higienizador, com objetivo de atestar a esterilidade do experimento.

A amostra do experimento consistiu de 240 espécimes confeccionados a partir de liga metálica de Co-Cr (Degudent GmbH, Hanau, Alemanha) e randomizados entre os grupos experimentais. Foram determinadas nove repetições para cada situação experimental.

Uma vez que não há fatores de variação vinculados para o cálculo do volume amostral, foram utilizados todos os níveis dos fatores independentes junto ao número de repetições (Volume amostral= $5 \times 5 \times 9 = 225$). Adicionalmente, como já relatado, quinze espécimes foram destinados ao controle da esterilidade.

Figura 1. Fatores de variação.

Figura 2. Soluções higienizadoras.

Tabela 1. Composição dos higienizadores comerciais.

Nome comercial	Fabricante	Composição
Cepacol	Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Suzano, SP, Brasil.	Cloreto de cetilpiridínio, EDTA dissódico, sacarina sódica, fosfato de sódio, fosfato dissódico, eucaliptol, mentol, salicilato de metila, aromatizante, perfume, Cl 19140 (tartrazina), álcool e água.
NitrAdine	BonifAG, Liechtenstein.	Vaduz, Ácido cítrico, lauril sulfato de sódio, lactose monoidratada, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, monopersulfato de potássio, carbonato de sódio, aromatizante de menta, PVP.

As soluções de *Ricinus communis* foram produzidas pelo Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil.

4.2 Delineamento estatístico

A contagem das UFC foi realizada em cada placa de Petri. No grupo de biofilme multiespécies, cada espécime foi semeado em três placas, com diferentes meios de cultura, para crescimento seletivo dos microrganismos. Desta forma, 900 dados foram analisados [5 (grupos de microrganismos) x 5 (soluções) x 9 (nº de repetições)] = 225 (placas).

4.3. Confecção dos corpos de prova

Para obtenção dos espécimes metálicos, foram obtidos padrões de cera (GEO, RenfertGmbH, Hilzingen, Alemanha) circulares (12 mm de diâmetro x 3 mm de espessura) a partir de uma matriz metálica, confeccionada na Oficina do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP (Figura 3). A cera foi

liquefeita em plastificador elétrico (BRAVAC, São Paulo, SP, Brasil) com temperatura média de 80°C e vertida com conta-gotas no interior da matriz.

Após a solidificação da cera, os excessos foram removidos com auxílio de espátula número 24 (Schobell Industrial Ltda, Rio Claro, SP, Brasil) aquecida, de forma que o orifício ficasse totalmente preenchido ao nível do limite de sua espessura, sem excessos ou falhas de material. A espátula aquecida foi utilizada sobre a superfície já acabada e nivelada para garantir sua lisura (Figura 4). O padrão de fundição de cera obtido foi mantido em recipiente plástico com água para evitar deformação e encaminhado à fundição.

Figura 3. Matriz metálica.

Figura 4. Acabamento do disco de cera.

Inclusão dos padrões de cera

Foram adicionados aos discos de cera os canais de alimentação (Cerafix Manufatura E Comércio de Ceras para Moldes Ltda, Pradópolis, SP, Brasil) com câmaras de compensação de tamanho grande (Figura 5). Cinco discos foram posicionados de forma equidistante na base formadora do cadinho (Figura 6) para aplicação do agente anti-bolhas (Silikon & Wachs, Entspannen, Alemanha).

Figura 5. Padrões de cera com canais de alimentação posicionados.

Figura 6. Posicionamento dos discos de cera no anel de fundição.

Os padrões de cera foram incluídos em revestimento fosfatado Micro Fine 1700 (Talladium do Brasil, Curitiba, PR, Brasil), manipulado na proporção de 180 g de pó, 32 mL de líquido e 12 mL de água destilada. O revestimento foi manipulado a vácuo (Espatuladora A300, Polidental, Cotia, SP, Brasil) por 60 segundos e para a presa final foram aguardados 30 minutos.

Os anéis foram levados ao forno Edgcon 5P (EDG, São Carlos, SP, Brasil) (Figura 7) para expansão do revestimento e eliminação da cera. O ciclo de aquecimento dos moldes foi realizado da seguinte maneira: aquecimento à velocidade de 15°C/min da temperatura ambiente até 300°C, permanecendo nesta temperatura por trinta minutos; aquecimento de 15°C/min até 950°C, permanecendo nesta temperatura por vinte minutos; resfriamento de 15°C/min até 900°C, permanecendo nesta temperatura por sessenta minutos.

Figura 7. Forno Edgcon 5P.

Fundição dos discos metálicos

A fundição foi realizada em máquina eletrônica Neutrodyn Easyti (F.Lli Manfredi, Torino, Itália) (Figura 8) por eletroindução a vácuo, padronizada e à temperatura de 1380°C e torque constante da centrífuga. Três lingotes de liga metálica de Co-Cr (Degudent GmbH, Hanau, Alemanha) foram necessários para fundição e injeção em cada molde.

Figura 8. Máquina eletrônica de fundição.

Quando resfriadas, as fundições foram desincluídas e jateadas com óxido de alumínio de granulação de 100 μm (Aluminum Oxide 100; Asfer Chemical Industry, Sao Caetano do Sul, Brazil), sob pressão de 3 bar, por cinco segundos, no Microjet III (EDG, São Carlos, Brasil), para remoção dos excessos de revestimento (Figura 9). Os discos foram separados dos canais de alimentação com auxílio de discos de carborundum (Figura 10) e, então, submetidos ao acabamento e polimento.

Figura 9. Discos metálicos após fundição.

Figura 10. Discos fundidos em Co-Cr sem acabamento e polimento.

Acabamento e polimento

A superfície lateral do corpo de prova recebeu acabamento com disco de carborundum e borracha de polimento na politriz Standard (Kota equipamentos, Cotia, SP, Brasil) (Figura 11).

Figura 11. Acabamento da superfície lateral do espécime metálico.

O acabamento e polimento das superfícies opostas dos discos metálicos foram executados por meio de politriz AROPOL-E (Arotec, Cotia-SP, Brasil), lixas de granulação 220, 400, 600 e 1200 (Norton Abrasivos Brasil, Saint-Gobain, França) (Figura 12), a 999 rpm. Cada disco foi acoplado em um dispositivo de resina acrílica autopolimerizável (VIPI Indústria, Comércio, Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil), desenvolvido na Oficina do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para facilitar a apreensão e padronização do acabamento dos espécimes durante o polimento (Figura 13).

Figura 12. Politriz AROPOL-E.

Figura 13. Dispositivo de resina.

Foram acoplados na politriz seis dispositivos de resina acrílica com disco metálico, por vez. Esses suportes receberam carga axial padronizada e constante, assim como irrigação com água corrente, durante toda a ação das lixas.

Para padronização das superfícies, em relação à lixa 220, os discos estiveram sob sua ação até que as superfícies ficassem totalmente uniformes, obtendo-se um padrão homogêneo. Para as demais lixas, foi pré-estabelecido o tempo de 10 minutos para cada. Após o uso de cada lixa, os espécimes metálicos foram lavados individualmente em água corrente a fim de remover qualquer partícula de metal ou grânulos remanescentes das lixas utilizadas.

O polimento final foi realizado manualmente com a lixa 1200, com movimentos elípticos, para refinar o polimento e eliminar possíveis rugosidades criadas pelo polimento automático, obtendo uma superfície homogênea. Finalmente todos os discos foram limpos com gaze e álcool para remoção de resíduos e oleosidade (Figura 14).

Figura 14. Disco metálico após acabamento e polimento.

Todas as superfícies foram polidas, respeitando-se um intervalo de rugosidade entre 0,04 μm e 0,11 μm , considerado dentro do limite clinicamente aceitável (Quirynen et al., 1995; Bollen et al., 1997), obtido com o rugosímetro de superfície (Surftest SJ-201P, Mitutoyo Corporation, Japão) (Figura 15).

Figura 15. Rugosímetro de superfície.

Na sequência, os espécimes metálicos foram distribuídos aleatoriamente e embalados em envelopes de papel grau cirúrgico (Envelope Grau Cirúrgico Termo Selável, Sispack, SP, Brasil) em grupos de três, selados e submetidos à esterilização com óxido de etileno, realizado pela empresa ACECIL (Central de Esterilização Comércio e Indústria Limitada, Campinas, São Paulo, Brasil)

4.4. Cepas microbianas

Quatro cepas foram selecionadas (Quadro 1) para contaminação dos espécimes metálicos, por serem microrganismos prevalentes em usuários de próteses bucais.

Quadro 1 – Cepas microbianas utilizadas.

Microrganismo	Identificação	Características Morfotintoriais
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	Cocos gram-positivos
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Cocos gram-positivos
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Leveduras
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001	Leveduras

O preparo do inóculo microbiano e as sementeiras ocorreram com meios de cultura específicos para cada cepa microbiana.

4.5. Divisão dos grupos experimentais

A fim de obter maior reprodutibilidade, o experimento foi executado em três etapas. Sendo assim, em cada etapa os espécimes metálicos foram distribuídos aleatoriamente e 15 espécimes foram contaminados com *S. mutans*, 15 com *S. aureus*, 15 com *C. albicans*, 15 com *C. glabrata* e 15 com o biofilme misto. Para cada solução higienizadora, foram destinados três espécimes de cada grupo de microrganismo, por etapa.

4.6. Preparo dos meios de cultura

Streptococcus mutans

O meio Brain Heart Infusion (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia) foi acrescido de 5% de glicose e usado para preparação do inóculo com *S. mutans* e para contaminação dos discos metálicos, que permaneceram por 48 horas sob agitação a 37°C. Para seu preparo, 52 g do meio desidratado foram adicionados a 1000 mL de água destilada e, então, esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, conforme orientação do fabricante.

Para sementeira da suspensão obtida após higienização e agitação dos discos contaminados com *S. mutans*, tanto no grupo de biofilme isolado, quanto no biofilme misto, foi utilizado o meio Mitis Salivarius Agar Base (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia). Sendo assim, 90 g do meio de cultura desidratado foram adicionados a 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, quando atingido o nível de

50 - 55°C, 20% de sacarose (Sacarose P.A. Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil) e 1% de bacitracina foi adicionado ao meio de cultura de desenvolvimento do *S. mutans* no grupo de biofilme misto.

Staphylococcus aureus

O meio Mueller Hinton Broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia) foi preparado com 21 g do meio de cultura desidratado adicionados a 1.000,00 mL de água destilada esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos, conforme instruções do fabricante.

A suspensão obtida após higienização e agitação dos espécimes contaminados com *S. aureus* no grupo do biofilme com microrganismo isolado, foi semeada no meio de cultura Mueller Hinton Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia). Para seu preparo, 38 g do meio de cultura desidratado foram adicionados a 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, de acordo com as instruções do fabricante.

Para crescimento no grupo do biofilme misto, a suspensão foi semeada em meio de cultura Mannitol Salt Agar. Cento e onze gramas do meio de cultura foram adicionados a 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, conforme instruções do fabricante.

Candida albicans* e *Candida glabrata

Foi utilizado o meio de cultura Sabouraud Dextrose Broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia) para obtenção do inóculo e contaminação dos espécimes metálicos, que ficaram incubados por 48 horas a 37°C, em agitação. Conforme instrução do fabricante, 30 g do meio de cultura desidratado foram adicionados a 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Para semear a suspensão microbiológica obtida, nos grupos inoculados com os microrganismo isolados, após higienização e agitação dos espécimes metálicos contaminados, foi utilizado o meio Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia). Foram adicionados 65 g do meio de cultura desidratado a 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, seguindo instruções do fabricante.

No grupo do biofilme misto, as suspensões obtidas foram semeadas no meio de cultura CHROMagar Candida Medium, capaz de selecionar e identificar as espécies de *Candida*. Para o preparo desse meio de cultura, 47,7 g do pó foram suspensos em 1000 mL de água purificada. A mistura foi aquecida sob agitação e ferveu por 1 minuto até se tornar homogênea, conforme instrução do fabricante.

Meio de cultura Lethen Broth

O meio de cultura Lethen Broth recebeu os espécimes metálicos após a higienização, com objetivo de neutralizar ação de possíveis resíduos dos higienizadores. As semeaduras em placas de Petri foram realizadas a partir de alíquotas das suspensões obtidas neste meio. A semeadura dessas alíquotas ocorreu em meios de cultura específicos. Esse meio também foi utilizado para avaliação de esterilidade a partir da observação da turvação ou não (sinal de esterilidade) do meio. 25,7 g do meio de cultura desidratado Lethen Broth (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA) foram adicionados a 1000 mL de água destilada e 5 g de Tween 80 (Liofilchen, PE, Itália) para seu preparo. O meio de cultura foi distribuído em alíquotas de 10 mL para cada tubo de ensaio de propileno com tampa rosqueável (TPP, Trasadingen, Suíça), tampado e esterilizado.

4.7. Diluição dos microrganismos para inoculação do meio de cultura

Após descongelamento e crescimento dos microrganismos por 48 horas em seus meios de cultura sólidos, e consequente reativação, uma colônia foi transferida ao seu respectivo caldo, que permaneceu incubado a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. O *pellet* resultante foi lavado duas vezes em PBS (*Phosphate Buffered Saline*).

Para determinar a concentração celular de 10^6 UFC/mL para as leveduras e 10^8 UFC/mL para as bactérias nos grupos de formação de biofilme com microrganismos isolados, e 10^7 UFC/mL de cada microrganismo no grupo do biofilme misto, foram realizados os seguintes procedimentos:

A diluição das bactérias foi avaliada segundo a turvação da suspensão verificada em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, Thermo Scientific Multiskan Spectrum, MA, EUA) (Figura 16), em comprimento de onda de 625 nm. Previamente, foi realizado uma calibração com 1 mL de PBS, esterilizado

em recipiente específico para análise, para obter a absorbância zero. A análise foi feita novamente, dessa vez com os microrganismos diluídos em PBS esterilizado. A leitura da absorbância contida entre 0,07 e 0,08 para *S. aureus*, e 0,09 e 0,095 para *S. mutans*, representaram a concentração de 10^8 UFC/mL desejada. Os valores foram confirmados por meio de semeadura em placa de Petri. A inoculação do meio de cultura foi realizada à concentração de 1×10^6 células/mL.

Figura 16. Espectrofotômetro Multiskan GO.

Para diluição das leveduras foi utilizada a câmara de Neubauer (Kasvi Importação E Distribuição de Produtos Para a Laboratorios Ltda., Curitiba, PR, Brasil) (Figura 17) para maior precisão, devido à morfologia variável do gênero.

A câmara de Neubauer contém uma lâmina grossa para uso em microscópio ótico, uma depressão no centro e duas câmaras, com linhas perpendiculares dividindo essas câmaras em quadrantes. Cada quadrante é destinado à contagem de células, por unidade de volume de uma suspensão. O quadrante de maior divisão, destinado às maiores células, é onde se realiza a contagem das leveduras.

Figura 17. Câmara de Neubauer.

O volume de cada quadrante é conhecido: 0,0001 mL. Sendo assim, a contagem de células torna-se viável. A partir de 10 μ L de suspensão da levedura

observados ao microscópio na câmara de Neubauer, obtém-se o número total nos 4 quadrantes periféricos e calcula-se a concentração de microrganismos da seguinte forma:

$$N = C/4 \times 10^4 \times D \text{ UFC/mL}$$

N: número total de UFC

C: Contagem de UFC nos quatro quadrantes periféricos

D: Diluição utilizada

A inoculação do meio de cultura com leveduras foi realizada com 10^6 células/mL. Os valores foram confirmados em semeadura em placa de Petri.

4.8. Contaminação dos espécimes metálicos

Os espécimes metálicos foram divididos em cinco grandes grupos principais, de acordo com o microrganismo a ser inoculado, e subdivididos em outros cinco grupos, de acordo com a solução higienizadora a ser utilizada no processo de imersão.

Em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, SP, Brasil), os espécimes foram dispostos em placas para cultura de células, com 24 compartimentos cilíndricos (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) que receberam 1,5 mL do meio de cultura previamente diluído (Figura 18), conforme descrito no tópico anterior. Apenas o grupo do biofilme misto foi contaminado com 0,5 mL do meio de cultura de cada microrganismo, à concentração de 10^7 células/mL, resultando em volume de 2 mL em cada poço da placa de cultura.

Figura 18. Placa para cultura com 15 espécimes inoculados e 1 controle de esterilidade.

Após um período de incubação de uma hora e trinta minutos, a 37°C, sob agitação de 75 rpm, em estufa bacteriológica (Incubadora Shaker, Mod. CE-320, CienLab, Campinas, SP, Brasil), os espécimes foram lavados duas vezes com o mesmo volume depositado anteriormente de PBS estéril, removendo células fracamente aderidas. 1,5 mL de meio de cultura estéril foi acrescentado (Figura 19) para maturação do biofilme nos grupos de microrganismos isolados, e 2 mL no grupo de biofilme misto. Sob as mesmas condições foram incubados por 48 horas. Nesse período, ao completar 24 horas, 1 mL foi retirado dos poços e substituído por 1mL do respectivo meio de cultura estéril.

Figura 19. Troca do meio de cultura.

Todo o cultivo do *S. mutans* e desenvolvimento do biofilme misto foi realizado em ambiente de microaerofilia (Figura 20).

Figura 20. Placa de cultura em microaerofilia.

4.9. Higienização dos espécimes metálicos

Completado o período de maturação do biofilme (Figura 21), os espécimes foram retirados dos poços com auxílio de uma pinça esterilizada (uma para cada grupo de microrganismo) e acomodados em cestas de aço inoxidável, com dimensões de 6 mm x 3 mm x 3 mm (Paranhos et al, 2009) (Figura 22) perfuradas e esterilizadas, previamente confeccionadas na Oficina de Precisão do Campus da USP de Ribeirão Preto (Paranhos et al., 2009). Os espécimes foram dispostos de forma que se apoiassem também sobre a parede lateral da cesta, assumindo uma posição transversal com o assoalho do dispositivo (Figura 23). Por meio de um fio de aço inoxidável adaptado sobre o topo do béquer, as cestas de imersão com NitrAdine foram suspensas pela sua alça, de forma que não tocassem o fundo do recipiente, igualmente esterilizado, que as continha, e ainda permitissem que os espécimes fossem totalmente cobertos pela solução.

Figura 21. Biofilme misto formado sobre o espécime metálico.

Figura 22. Cesta de aço inoxidável.

Figura 23. Espécimes dispostos na cesta.

Os recipientes receberam 150 mL das soluções higienizadoras, já que as instruções de uso do NitrAdine indicam o uso de 150 mL de água para dissolução da pastilha. Imediatamente após o preparo das soluções higienizadoras, as cestas foram posicionadas, contendo os espécimes. As imersões foram realizadas simultaneamente (Figura 24).

Fig.24. Imersão simultânea.

Os espécimes permaneceram em imersão por 20 minutos em soluções experimentais de *Ricinus communis* 2% (Pisani et al., 2012; Andrade et al., 2014) e 10% (Badaró et al., 2013; Salles et al., 2015), 10 minutos em Cepacol (Felipucci, 2011; Davi, 2012; Paranhos et al., 2014) e 15 minutos em 150 mL de água morna a temperatura de 37°C e uma pastilha de Nitradine, conforme orientações do fabricante. A imersão em água destilada por 20 minutos foi utilizada para comparação.

Após os tempos de ação de cada solução, cada cesta, contendo os espécimes, foi transferida para um recipiente esterilizado contendo 150 mL de água destilada e permaneceu imersa por 5 minutos, para remoção de resíduos das soluções.

Após a última imersão, os espécimes foram removidos da cesta por meio de uma pinça esterilizada e conduzidos à imersão sequencial em três placas de Petri contendo água destilada estéril (Figura 25) destinadas, exclusivamente, a cada grupo de microrganismo.

Figura 25. Imersão sequencial em água destilada para remoção de resíduos das soluções higienizadoras.

Análise da viabilidade celular

Após enxague seriado, cada espécime foi inserido em um tubo de propileno de 50 mL, devidamente identificado, contendo 10 mL de meio Letheen Broth estéril. Os tubos com os espécimes foram agitados por 20 minutos em ultrassom para o desprendimento das células aderidas aos espécimes.

Finalizada a agitação, 25 μ L da suspensão obtida foram semeados (diluição 10^0) e 25 μ L foram depositados em tubo de propileno de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) contendo 225 μ L de PBS igualmente estéril (Figura 26). O tubo foi agitado para homogeneizar a amostra, e novamente 25 μ L foram semeados (diluição 10^{-1}) e 25 μ L foram depositados em outro tubo contendo 225 μ L de PBS. O processo de diluição se repetiu até que as diluições seriadas de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} fossem semeadas em placas de Petri. Cada grupo foi semeado em seus meios de cultura correspondentes (Figura 27) e incubado a 37°C por 24 horas. As placas destinadas ao crescimento de *S. mutans* foram incubadas em ambiente de microaerofilia por 48 horas, para que o maior crescimento das colônias possibilitasse a leitura das placas.

Figura 26. Diluição seriada.

Figura 27. Semeadura em meio de cultura.

Após a incubação e contagem do número de colônias, os valores de UFC/ml foram calculados, por meio da fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias} \times 10^n}{q}, \text{ sendo:}$$

n: valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3);
q: quantidade, em ml, pipetada para cada diluição quando da sementeira.

Os tubos contendo a suspensão obtida após agitação dos espécimes metálicos, previamente higienizados, foram também mantidos em estufa a 37°C até que fosse observada a turvação do meio Letheen Broth (Figura 28), sinal de crescimento de microrganismos neste meio de cultura. Os tubos deveriam ser mantidos em estufa por até 28 dias em caso de ausência de turvação, o que não foi necessário, já que a turvação ocorreu no mesmo período de incubação das placas.

Figura 28. Turvação do meio Leethen Broth em tubos de propileno contendo espécimes metálicos após higienização.

Nos espécimes metálicos destinados ao controle da esterilidade ocorreu ausência de turvação.

4.10. Análise da viabilidade celular

A fim de analisar a viabilidade celular do biofilme de *C. albicans*, dois espécimes de cada grupo de higienizador, após imersão, foram transferidos para uma placa de 12 poços. Para o preparo do corante, foram adicionados 2,5 μ L da solução do componente A e 2,5 μ L da solução do componente B a 15 mL de PBS. Sobre a superfície do corpo de prova foram adicionados 1,5 mL dessa mistura, seguido de incubação em ambiente protegido de luz e a temperatura ambiente durante 15 minutos. Os corpos de prova foram lavados com PBS por 1 minuto e observados em Microscópio de Epifluorescência (Axioskop II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com filtros apropriados, ou seja, o FITC para evidênciação de todas as células viáveis presente no biofilme (em verde) e o RHOD para evidênciação das células mortas (em vermelho).

Foram capturadas 40 imagens, sendo 20 para cada espécime metálico, 10 para cada filtro (10 verdes e 10 vermelhos).

4.11. Análise estatística

A partir dos valores de UFC/mL foram calculados os valores de $\log_{10}(\text{UFC}+1)$. Os dados obtidos foram então submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar como se apresentava sua distribuição. Para o grupo dos microrganismos isolados de *Ca* e *Cg*, os quais apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste

paramétrico ANOVA; e se constatada significância (apenas para *Cg*), foi aplicado pós teste de Tukey. Nos demais grupos de microrganismos isolados (*Sm* e *Sa*) e biofilme misto, os dados apresentaram distribuição não-normal, logo foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dunn. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 0,05.

5. Resultados

5.1. Análise de esterilidade

A Tabela 2 apresenta os resultados da turvação dos meios de cultura dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após a imersão nas soluções higienizadoras e incubação em estufa.

Tabela 2. Turvação dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após a imersão nas soluções higienizadoras.

Grupos	Ca	Cg	Sa	Sm	Biofilme misto
Rc 2%	+	+	+	+	+
Rc 10%	+	+	+	+	+
CCP	+	+	+	+	+
NA	+	+	+	+	+
AD	+	+	+	+	+
Controle de esterilidade	-	-	-	-	-

Microrganismos: *Ca*: *Candida albicans*; *Cg*: *Candida glabrata*; *Sa*: *Staphylococcus aureus*; *Sm*: *Streptococcus mutans*; Biofilme misto: *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus mutans*. (+): indica turvação do meio, (-) indica ausência de turvação.

Os resultados demonstram turvação dos meios de cultura para todos os grupos experimentais, indicando crescimento de todas as cepas avaliadas. A ausência de turvação do grupo de controle da esterilidade mostra a ausência de contaminação dos espécimes antes do início de experimento.

5.2. Análise antimicrobiana

As Tabelas 3 a 6 apresentam os resultados (UFC/mL) de cada cepa microbiana avaliada de forma isolada, em $\log_{10}^{(UFC+1)}$.

Tabela 3. *Candida albicans* - Total de UFC/mL, em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$

Espécimes	<i>Ricinus Communis</i> 2%	<i>Ricinus Communis</i> 10%	Cepacol	NitrAdine	Água destilada
1	4,44	4,17	3,70	3,54	2,94
2	4,64	4,96	3,02	3,39	4,85
3	3,38	2,64	3,69	3,66	3,82
4	5,32	5,01	6,03	3,45	4,30
5	3,67	5,66	5,62	5,41	5,62
6	3,58	6,00	5,97	2,56	4,18
7	3,32	4,55	6,42	5,76	4,44
8	4,12	3,91	5,37	3,97	4,35
9	5,59	3,47	6,21	4,80	4,26

Tabela 4. *Candida glabrata* - Total de UFC/mL, em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$

Espécimes	<i>Ricinus Communis</i> 2%	<i>Ricinus Communis</i> 10%	Cepacol	NitrAdine	Água destilada
1	3,94	5,57	5,19	4,31	5,41
2	3,64	4,99	4,91	3,63	5,32
3	4,47	4,80	4,70	3,03	5,56
4	5,11	6,08	4,64	5,38	5,70
5	5,29	5,79	4,43	3,33	5,70
6	5,20	5,75	4,00	4,98	5,59
7	5,70	4,62	4,72	3,88	5,61
8	4,40	5,29	4,13	4,45	6,14
9	5,06	5,18	4,59	5,04	3,00

Tabela 5 - *Staphylococcus aureus* - Total de UFC/mL, em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$

Espécimes	<i>Ricinus Communis</i> 2%	<i>Ricinus Communis</i> 10%	Cepacol	NitrAdine	Água destilada
1	4,00	5,52	4,88	6,15	5,52
2	5,90	5,20	5,44	3,61	5,98
3	5,09	5,27	4,36	3,54	6,21
4	5,08	5,51	6,58	5,63	6,21
5	5,16	4,61	3,34	3,40	6,21
6	5,09	4,72	5,16	5,05	6,54
7	6,12	5,89	6,12	5,77	6,37
8	5,30	5,46	5,27	5,20	5,55
9	5,74	4,95	5,15	3,26	5,28

Tabela 6. *Streptococcus mutans* - Total de UFC/mL, em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$

Espécimes	<i>Ricinus Communis 2%</i>	<i>Ricinus Communis 10%</i>	Cepacol	NitrAdine	Água destilada
1	7,06	7,43	5,19	4,31	5,41
2	7,74	6,73	4,91	3,63	5,32
3	7,64	7,36	4,70	3,03	5,56
4	3,94	5,57	5,56	0,00	7,69
5	3,64	4,99	6,84	0,00	6,42
6	4,47	4,80	6,26	2,81	7,68
7	7,66	7,10	7,60	0,00	7,84
8	7,90	6,98	6,43	4,53	7,30
9	7,61	6,63	6,72	0,00	4,43

As Tabelas 7 a 10 apresentam os resultados (UFC/mL) de cada cepa microbiana avaliada dentro do grupo de biofilme misto, em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$.

As Figuras 29 a 31 mostram placas de Petri com crescimento das colônias microbianas do biofilme misto, obtidas para leitura e cálculo das UFC/mL.

Tabela 7. *Candida albicans* no biofilme misto - Total de UFC/mL, em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$

Espécimes	<i>Ricinus Communis 2%</i>	<i>Ricinus Communis 10%</i>	Cepacol	NitrAdine	Água destilada
1	6,61	3,73	6,65	6,63	6,78
2	6,40	3,36	6,09	6,48	6,97
3	6,55	6,37	6,37	6,78	6,52
4	4,86	5,99	4,55	5,85	5,91
5	6,28	5,92	5,75	5,47	6,45
6	5,64	5,76	6,41	5,80	5,85
7	6,19	6,74	6,35	4,56	5,97
8	6,08	6,72	6,05	5,92	6,81
9	5,88	6,72	6,24	6,13	6,56

Tabela 8. *Candida glabrata* no biofilme misto - Total de UFC/mL, em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$

Espécimes	<i>Ricinus Communis</i> 2%	<i>Ricinus Communis</i> 10%	Cepacol	NitrAdine	Água destilada
1	6,17	5,83	6,45	5,45	6,48
2	6,21	6,12	6,08	6,45	6,92
3	6,17	6,27	6,28	6,17	6,57
4	5,18	5,83	2,60	4,30	6,09
5	6,56	5,94	4,38	4,86	6,52
6	5,83	5,81	6,23	3,90	6,35
7	6,25	6,00	5,76	5,69	6,45
8	6,19	2,78	3,90	4,38	5,54
9	6,12	5,68	3,90	5,56	6,66

Figura 29. Crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata* em meio de cultura CHROMagar Candida Medium.

Tabela 9. *Staphylococcus aureus* no biofilme misto - Total de UFC/mL, em $\log_{10}^{(\text{UFC} + 1)}$

Espécimes	<i>Ricinus Communis</i> 2%	<i>Ricinus Communis</i> 10%	Cepacol	NitrAdine	Água destilada
1	3,56	3,83	4,27	4,90	3,97
2	4,37	2,08	2,72	2,88	3,65
3	3,49	1,61	1,91	2,75	3,19
4	4,37	5,61	3,81	5,84	3,69
5	3,62	3,76	5,39	0,00	4,18
6	4,08	2,60	4,98	2,45	4,80
7	5,25	0,00	4,66	2,08	5,49
8	4,68	4,95	4,33	3,60	4,48
9	5,76	3,72	2,94	4,31	3,74

Figura 30. Crescimento de *S. aureus* em meio de cultura Mannitol Salt Agar.

Tabela 10. *Streptococcus mutans* no biofilme misto - Total de UFC/mL, em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$.

Espécimes	<i>Ricinus Communis 2%</i>	<i>Ricinus Communis 10%</i>	Cepacol	NitrAdine	Água destilada
1	6,60	6,89	7,42	5,06	6,73
2	6,62	4,37	6,78	0,00	7,23
3	6,93	6,31	6,27	0,00	6,62
4	7,13	7,31	6,00	6,30	7,04
5	7,39	7,42	7,55	0,00	7,57
6	7,47	7,12	7,50	4,08	7,44
7	7,39	6,62	7,07	0,00	6,87
8	6,95	7,23	7,50	5,02	5,98
9	7,34	7,51	7,11	0,00	7,01

Figura 31. Crescimento de *S. mutans* em meio de cultura Mitis Salivarius Agar Base..

5.3. Análise estatística

As Tabelas 11 e 12 apresentam os resultados da análise estatística para os grupos de espécies em desenvolvimento isolado.

Tabela 11. UFC/mL em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$ - Medianas (intervalo de confiança de 95%) e valores do ANOVA relativos a *C. albicans* e *C. glabrata*.

Grupos	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
Rc 2%	4,23(0,83)	4,76(0,68) ^{a,b}
Rc 10%	4,49(1,06)	5,34(0,49) ^a
CCP	5,11(1,29)	4,59(0,37) ^{a,b}
NA	4,06(1,05)	4,23(0,82) ^b
AD	4,31(0,72)	5,33(0,91) ^a
ANOVA	p=0,231	p=0,004

^{a,b} Letras iguais indicam semelhanças estatísticas ($p > 0,05$) no *post test* de Tukey.

Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos apenas para a *C. glabrata*. Houve redução significativa do UFC dos espécimes tratados com NA e valores intermediários para os tratados com RC 2% e o CCP quando comparados com a água destilada (controle).

Tabela 12. UFC/mL em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$ - Medianas (intervalo de confiança de 95%) e valores do Kruskal-Wallis relativos a *S. aureus* e *S. mutans*.

Grupos	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>
Rc 2%	5,16(4,80;5,75) ^{a,b}	7,61(5,01;7,80) ^a
Rc 10%	5,27(4,92;5,56) ^{a,b}	6,73(5,62;7,18) ^a
CCP	5,16(4,42;5,87) ^{a,b}	6,26(5,27;6,78) ^a
NA	5,05(3,73;5,51) ^b	2,81(0,49;3,57) ^b
AD	6,21(5,65;6,32) ^a	6,42(5,43;7,38) ^a
Kruskal-Wallis	p= 0,014	p=0,000

^{a,b} Letras iguais indicam semelhanças estatísticas ($p > 0,05$) no *post test* de Dunn.

Os resultados mostraram redução significativa de UFC de *S. aureus* (grupo NA) e valores intermediários (RC 2%, RC 10% e CPC) quando comparados ao grupo de água destilada. Houve redução significativa de UFC de *S. mutans* apenas no grupo NA.

As Tabelas 13 e 14 apresentam os resultados da análise estatística para os grupos de espécies em desenvolvimento no biofilme misto.

Tabela 13. UFC/mL em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$ - Medianas (intervalo de confiança de 95%) e valores do Kruskal-Wallis relativos a *C. albicans* e *C. glabrata*, no biofilme misto.

Grupos	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
Rc 2%	6,19(5,64;6,47)	6,17(5,78;6,37) ^{a,b}
Rc 10%	5,99(4,72;6,68)	5,83(4,76;6,40) ^{a,b}
CCP	6,24(5,58;6,53)	5,76(3,99;6,14) ^b
NA	5,92(5,44;6,48)	5,45(4,52;5,87) ^b
AD	6,52(6,10;6,75)	6,48(6,10;6,70) ^a
Kruskal-Wallis	p=0,463	p=0,004

^{a,b} Letras iguais indicam semelhanças estatísticas ($p > 0,05$) no *post test* de Dunn.

Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos apenas para *C. glabrata*. Os grupos de NA e CPC apresentaram redução significativa de UFC, enquanto RC 2% e 10% apresentaram valores intermediários, quando comparados a água destilada.

Tabela 14. UFC/mL em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$ - Medianas (intervalo de confiança de 95%) e valores do Kruskal-Wallis relativos a *S. aureus* e *S. mutans*, no biofilme misto.

Grupos	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>
Rc 2%	4,37(3,75;4,95)	7,13(6,83;7,35) ^a
Rc 10%	3,72(1,79;4,47)	7,12(6,00;7,50) ^a
CCP	4,27(3,00;4,77)	7,11(6,59;7,46) ^a
NA	2,88(1,88;4,52)	0(0,16;4,39) ^b
AD	3,97(3,59;4,67)	7,01(6,58;7,31) ^a
Kruskal-Wallis	p=0,349	p=0,000

^{a,b} Letras iguais indicam semelhanças estatísticas ($p > 0,05$) no *post test* de Dunn.

Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos apenas para *S. mutans*, com redução significativa de UFC para o grupo NA.

5.4. Análise da viabilidade celular

Devido à ausência de diferença estatisticamente significativa na redução de UFC de *C. albicans*, 2 espécimes de cada grupo de solução higienizadora foram

destinados à análise da morfologia e viabilidade celular, após imersão, em Microscópio de Epifluorescência (Axioskop II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Observou-se nas imagens a presença tanto de células viáveis, quanto mortas em todos os grupos de soluções (Figuras 32 e 33). Foi possível notar o desenvolvimento de hifas e culturas isoladas nas análises.

Figura 32. Imagem de epifluorescência mostrando células de *C. albicans* viáveis (verde) e mortas (vermelho) sobre espécime imerso em NitrAdine.

Figura 33. Imagem de epifluorescência mostrando células de *C. albicans* viáveis (verde) e mortas (vermelho) sobre espécime imerso em água destilada.

6 Discussão

A hipótese nula deste trabalho foi rejeitada, visto que as soluções apresentaram diferente ação antimicrobiana frente a cada grupo de microrganismos.

Sabe-se que a associação dos métodos químico ao mecânico como protocolo de limpeza de próteses dentárias é interessante, principalmente para a prática de pacientes idosos, com comprometimento da acuidade visual e da coordenação motora, já que a imersão da prótese em soluções higienizadoras permite alcançar áreas de difícil remoção do biofilme somente pela escovação (Nikawa et al., 1999; Shay 2000; Ramage et al., 2004).

A ação antimicrobiana das soluções higienizadoras é um fator fundamental a ser avaliado. Muitos produtos apresentam composição complexa e variada (Nikawa et al., 1999; Coimbra, 2016) e o acúmulo de biofilme sobre as superfícies da prótese pode favorecer a proliferação de microrganismos envolvidos com o surgimento de afecções locais, como estomatite protética (Ramage et al., 2004; Coco et al., 2008; Pereira-Cenci et al., 2008b) e sistêmicas, como endocardites (Li et al., 2000), pneumonias, doenças pulmonares e obstrutivas crônicas (Sumi et al., 2002), infecções generalizadas e outras desordens sistêmicas (Verran, Maryan, 1997; Nikawa; Hamada; Yamamoto, 1998; Coulthwaite; Verran, 2007).

A indicação de um agente químico para higienização de PPR na prática clínica deve ser cautelosa, visto que deve ser capaz de eliminar os microrganismos presentes, além de apresentar ação compatível com a resina acrílica termopolimerizável e sua estrutura metálica, normalmente confeccionada com liga de Co-Cr, não ser tóxico, ser de baixo custo facilmente realizado pelo paciente (Sheen, Harrison, 2000; Silva-Lovato et al., 2010). A liga de Co-Cr quando em contato com soluções de cloro podem apresentar sinais de corrosão, assim como manchamento, devido ao oxigênio liberado pelos agentes higienizadores (Backenstone, Wells, 1977; Keyf, Gungor, 2003; Felipucci, 2001a,b).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de soluções encontradas no mercado e da solução experimental de *Ricinus communis*, em relação a microrganismos prevalentes na cavidade bucal de usuários de próteses. Foi analisada a ação antimicrobiana da solução de mamona nas concentrações de 2 e 10%, já que essa solução tem sido estudada na literatura (Ito

et al., 1999; Siqueira, 2005; Takano, 2007; Badaró, 2013; Pinelli, 2013; Leite et al., 2014; Salles et al., 2015), e pode se apresentar como alternativa para higienização de PPR. Foi avaliada também a ação do enxaguatório bucal cloreto de cetilpiridínio 0,05% (Cepacol), conforme efeito antimicrobiano descrito previamente (Ito et al., 1985; Menendez et al., 2005; Watanabe, 2008), e a pastilha efervescente (NitrAdine), cuja ação antimicrobiana também fora constatada (Silva-Lovato et al., 2010; Coimbra, 2016; Sedrez-Porto et al., 2016).

Mais de 700 espécies bacterianas podem ser detectadas na cavidade oral, entre as quais pelo menos 50% não são cultiváveis *in vitro* (Aas et al., 2005). No entanto, testes laboratoriais possibilitam melhor conhecimento dos parâmetros microbiológicos sobre microrganismos patógenos comumente presentes na microbiota oral (André et al., 2011). Entre os biofilmes analisados, os formados a partir de culturas de microrganismos isolados têm o objetivo de fornecer entendimento melhor a respeito da ação antimicrobiana específica de cada solução sobre cada espécie de microrganismo, de forma individual. O biofilme misto permite observar resultados decorrentes da interação microbiana (Drake et al., 1992; Nikawa et al., 1999; Li et al., 2010; Salles, 2013), simulando situação mais próxima da observada na cavidade bucal.

A metodologia empregada analisou o método de imersão *in vitro*, sem associação ao método mecânico, já que a associação de métodos promove sinergismo de ação (Paranhos et al., 2009), tendo propiciado, assim, avaliação objetiva da capacidade das soluções em reduzir a quantidade de cada microrganismo (Nikawa et al., 1999). Os tempos de imersão foram definidos conforme orientações do fabricantes e achados na literatura (Felipucci et al., 2011a; Felipucci et al., 2011b; Davi et al., 2012; Paranhos et al., 2014; Andrade et al., 2014; Sorgini et al., 2015; Salles et al., 2015; Badaró et al. 2016).

Durante a obtenção dos espécimes metálicos, o acabamento e polimento foram fatores bastante considerados, uma vez que a rugosidade superficial está diretamente relacionada a essas etapas (Whitehead et al., 1999). Taylor et al. (1998) deduziram, ao correlacionar o tamanho das células bacterianas e o tipo de rugosidade superficial de superfícies de Co-Cr, que esses fatores afetam significativamente a retenção de microrganismos em superfícies. O polimento selecionado para o presente trabalho, resultou em rugosidade superficial abaixo

do limite clínico aceitável de 0,2 μm (Quirynen et al., 1995; Bollen et al., 1997). Caso contrário, poderia ocorrer maior acúmulo de biofilme sobre a superfície e comprometer a ação dos higienizadores (Verran, Motteram, 1987; Radford et al., 1998; Nikawa et al., 2003).

Os resultados mostraram capacidade de redução da quantidade de UFC variada em relação a cada microrganismo, assim como no grupo de biofilme multiespécies, o qual continha todas as espécies associadas em um mesmo espécime metálico. Apenas o NitrAdine apresentou ação antimicrobiana contra o *Streptococcus mutans* em relação ao controle (água destilada). Tal fato também ocorreu no grupo do biofilme misto. Mordenti et al. (1982) relataram que o ricinoleato só poderia eliminar *S. mutans* em suspensão e não aquelas outras espécies presentes no biofilme, adicionalmente sugeriram que haveria correlação entre o tratamento com o ricinoleato com diminuição da produção de ácido no biofilme, o qual poderia retardar processos de doença em dentes e gengivas (Pinelli et al., 2012).

A análise da ação antimicrobiana dos higienizadores de prótese sobre bactérias também tem grande importância devido à relação com estomatite protética. Muitos autores descrevem a participação de bactérias no desenvolvimento dessa afecção (Pereira-Cenci et al., 2008a,b; Vasconcelos et al., 2010; Sesma, Marimoto, 2011; Takahashi, Nyvad, 2011; Cavalcanti et al., 2016).

Estudos também demonstram que a virulência de microrganismos *Candida spp.* pode ser modulada pela presença de bactérias no mesmo biofilme (Verran, Motteram, 1987). A co-cultura de *C. albicans* com *Streptococcus spp.* conduz ao aumento da formação de hifas, condição que influencia o desenvolvimento de biofilmes robustos, bem como interações entre células e substrato. Adicionalmente, pode acarretar produção de matriz extracelular e expressão de vários genes de virulência de *C. albicans* (Cavalcanti et al., 2016). Lucena-Ferreira et al. (2014) observaram em imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal que, após 7 dias de higienização com pastilha efervescente à base de peróxido alcalino (Polident), o número de *C. albicans* aumentou, assim como sua expressão em forma de hifas. Também houve aumento significativo da concentração de polissacarídeos no biofilme, mesmo tendo sido eficaz sobre outras espécies no biofilme misto. Esses dados são importantes, visto que imersões em

produtos higienizadores de prótese podem ser métodos efetivos em controlar o biofilme bacteriano, mas podem potencialmente favorecer o desenvolvimento de *C. albicans* (Allison et al., 2016), importante agente da estomatite protética (Lucena-Ferreira et al., 2014).

Os resultados mostraram que nenhum higienizador realmente apresentou ação antimicrobiana, comparados à água destilada, em relação à redução de colônias de *C. albicans*. Esses resultados corroboram os achados de Andrade et al. (2010) que avaliaram a ação antimicrobiana do peróxido alcalino (Corega Tabs) e ultrassom frente a cepas *Candida spp.* e *S. mutans* em biofilmes de próteses totais e verificaram que o peróxido reduziu e a quantidade de *S. mutans*, porém não foi eficaz contra *C. albicans*. O ultrassom apresentou discreto efeito antimicrobiano e foi menos efetivo que o peróxido alcalino. Paranhos et al. (2009) questionaram a variabilidade da eficácia de diversos métodos de higienização sobre diferentes biofilmes microbianos.

Outros autores também descreveram a atividade antimicrobiana de peróxidos contra *Streptococcus spp.* e inefetividade contra *C. albicans* (Dills et al., 1988 e Drake et al., 1992). Ferreira et al. (2009) estudaram o efeito de Polident, Efferdent e hipoclorito de sódio 0,5% na aderência de *Candida* a reembasadores de prótese e constataram que os peróxidos não foram eficazes na prevenção da adesão inicial de *Candida*, tendo sido efetivo somente o hipoclorito de sódio 0,5%.

Devido à ausência de ação antimicrobiana dos higienizadores sobre as cepas de *C. albicans* neste trabalho, foi realizada a repetição para esse grupo de cultura isolada, a fim de verificar algum tipo de viés durante os procedimentos de cultura. Os resultados se repetiram, e nenhum higienizador foi mesmo capaz de reduzir significativamente as UFC de *C. albicans*. Sendo assim, optou-se por fazer análise em Microscópio de Epifluorescência, de dois corpos de prova de cada grupo de higienizador, contaminados com *C. albicans*, para avaliação da morfologia e viabilidade celular do biofilme após higienização. Segundo Tawakoli et al., 2016, os microrganismos parecem ter capacidade de entrar em estado de “dormência”, interpretado como um estado reversível, como estratégia de sobrevivência. Células com metabolismo ativo e alta taxa de crescimento fluorescem mais que as outras nesse tipo de análise. Microrganismos vivos foram observados, mas também mortos, em todos os grupos de higienizadores avaliados, o que pode ser explicado

pelo fato que muitas células perdem sua viabilidade rapidamente após o preparo do espécime com corantes (Tawakoli et al., 2016).

Conclusões controversas são encontradas na literatura quanto à atividade antimicrobiana de peróxidos. Corroborando os resultados obtidos, estudos apontam ineficiência desses higienizadores em eliminar *Candida albicans* de próteses (Gornitsky et al., 2002; Ferreira et al., 2009; Andrade et al., 2011; Leite et al., 2014; Lucena-Ferreira et al., 2014). Lucena-Ferreira et al., 2014, verificaram *in vivo* a ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes em usuários de PPR e concluíram que, embora a quantidade de *S. mutans* tenha sido reduzida, as pastilhas foram ineficazes sobre *C. albicans*. Em contrapartida, outros autores observaram eficácia desses produtos em eliminar *Candida spp* (Coimbra, 2014; Khan et al., 2016; Kiesow et al., 2016). Paranhos et al. (2009) demonstraram que a imersão em higienizador à base de peróxido alcalino (Bony Plus) foi eficaz contra *C. albicans*. Silva-Lovato et al. (2010) analisaram também a eficácia do NitrAdine quanto à remoção de biofilme e ação antimicrobiana em próteses totais e observaram que houve redução do biofilme e de número de colônias de *Candida spp.* nas próteses em comparação com o grupo controle. Os mecanismos de ação dos diferentes peróxidos alcalinos encontrados no mercado não são amplamente esclarecidos pela literatura, principalmente pela sua variabilidade de composição (Coimbra, 2016). A maioria das pastilhas efervescentes para limpeza de próteses tem como ingrediente ativo perborato de sódio ou percarbonato de sódio e um detergente alcalino, como o fosfato trissódico (Dhamane et al., 2012).

A pastilha efervescente NitrAdine foi selecionada para este trabalho porque vários autores descreveram sua ação antimicrobiana relacionada a biofilmes em espécimes de resina acrílica (Silva-Lovato et al, 2010; Coimbra, 2016; Sedrez-Porto et al., 2016). Apresenta em sua composição o ácido cítrico, responsável por quebrar pontes de íons cálcio que servem como sítios de ligação química para as cadeias poliméricas extracelulares, e o lauril sulfato de sódio, que solubiliza proteínas, os quais podem ser responsabilizados por sua eficácia (Moore et al., 1984; Desrosiers, et al., 2007; Silva-Lovato et al., 2010; Dhamane et al., 2012).

Os resultados mostraram maior atividade antimicrobiana do NitrAdine em relação à redução de colônias de *Candida glabrata*, tanto no biofilme multiespécies, quanto no isolado. O Cepacol apresentou redução igualmente significativa quanto à

redução de colônias no biofilme misto e as soluções de *Ricinus communis* apresentaram resultados intermediários. No biofilme isolado, o Cepacol e a solução de *Ricinus communis* a 2% apresentaram valores intermediários.

A diferença entre a ação antimicrobiana dos higienizadores no biofilme formado a partir de colônias isoladas e no biofilme multiespécies sugere diferente susceptibilidade decorrente de composição ou disposição nas diferentes nas camadas do biofilme. Sendo assim, o sinergismo entre espécies pode determinar o desenvolvimento do biofilme. Drake et al. (1992) sugerem que o *S. mutans*, conhecido pela sua capacidade de secretar polissacarídeos, é capaz de produzir uma barreira protetora, que modifica a exposição de leveduras a componentes antimicrobianos dos higienizadores. Além disso, microrganismos dispostos mais superficialmente estão consequentemente mais expostos a agentes antimicrobianos (Andrade et al., 2011; Lucena-Ferreira et al., 2013), o que pode explicar a variabilidade de atividade antimicrobiana dos higienizadores sobre os biofilmes isolados e misto.

Apenas o NitrAdine foi capaz de reduzir as colônias de *S. aureus*, no biofilme isolado. As outras soluções apresentaram resultados intermediários. Estudos apontam efetividade da solução de *Ricinus communis* em reduzir a quantidade de *S. aureus*, quando cultivados em suspensão ou em biofilmes isolados (Watanabe, 2013; Leite et al., 2014; Salles et al., 2015). Estudos demonstram a ação do Cepacol contra cepas, na forma isolada, de *S. aureus* (Semenoff et al., 2008; Borges et al., 2010). O biofilme multiespécies tem uma composição mais complexa, e quanto mais complexa a composição dos biofilmes, mais resistentes são aos procedimentos de desinfecção (Pereira et al., 2011), isso pode explicar porque nenhuma solução reduziu significativamente o número de colônias de *S. aureus* no grupo do biofilme misto, em relação à água destilada.

A literatura também não é conclusiva quanto à capacidade dos peróxidos agirem contra *S. aureus*. Lee et al. (2009), mostraram que após 5 minutos de imersão em higienizador à base de peróxido alcalino (Steradent), houve ação intermediária em *S. aureus* resistentes à metilicina. Paranhos et al., (2009) mostraram que, peróxido alcalino (Bony Plus) não apresentou ação antimicrobiana sobre *S. aureus* em imersões de 5 minutos.

Alguns estudos exploram a capacidade de aplicação da solução de *Ricinus communis* na Odontologia (Siqueira, 2005; Pisani et al., 2010; Badaró, 2013; Pinelli et al., 2013; Watanabe et al., 2013; Andrade et al., 2014; Leite et al., 2014; Salles et al., 2015). *Entretanto*, mais pesquisas são necessárias para elucidar melhor seu potencial antimicrobiano sobre ligas metálicas, concentração ideal, mecanismo de ação, forma de uso e efeitos adversos.

Mesmo com grande gama de trabalhos a respeito da avaliação de higienizadores, ainda são incertos a melhor indicação e uso. Isso se deve pela variabilidade entre as metodologias utilizadas e resultados (Nikawa et al., 1999; Pereira-Cenci et al., 2008b). A diferença entre os dados apresentados pela literatura pode ser decorrente das diferentes superfícies empregadas na formação do biofilme, já que a maioria explora a superfície de resina acrílica (Silva, FC, et al., 2008; Lee et al., 2009; Paranhos et al., 2009; Li et al., 2010; Paraniello, 2013; Coimbra et al., 2016). São poucos trabalhos que demonstram ação antimicrobiana de substâncias sobre superfície metálica (Taylor et al., 1998). Características diferentes de superfície geram colonizações microbianas distintas (Radford, et al., 1998; Taylor et al., 1998). O estado de maturação do biofilme também pode interferir na ação antimicrobiana de higienizadores (Li et al., 2010; Lee et al., 2014; Schwindling et al., 2014). Desta forma, um mesmo microrganismo pode ser afetado de forma diferente pelo higienizador, dependendo do material onde ele está alojado (Li et al., 2010).

Há a possibilidade também da composição da película formada sobre ligas metálicas ser distinta, por ter pontos isoelétricos diferentes (Urushibara et al., 2014). Vários fatores interferem na adesão de microrganismos, como diferenças na carga da película sobre a superfície, forças de van der Waals e eletrostáticas, hidrofobicidade e a presença de lectinas ligantes (Cowan et al., 1986).

Diante da falta de um protocolo padrão de higienização para todos os usuários de PPR (Sedrez-Porto et al., 2016), ainda é necessário que as possíveis alterações e interações na superfície dos materiais constituintes da prótese e a ação antimicrobiana de soluções potencialmente indicadas para esse fim sejam mais exploradas pela literatura. Em suma, os resultados dos experimentos *in vitro* apresentados possibilitam observar ação variada dos higienizadores de acordo com a espécie de microrganismo e com seu desenvolvimento, a partir de cepas

isoladas ou multiespécies. Estima-se que os resultados possam contribuir para maior conformidade e estabelecimento de protocolo seguro, acessível e eficaz que possa ser instituído para higienização de PPR.

7. Conclusões

Com base nas condições experimentais e metodologia utilizadas neste estudo, é possível inferir que:

1. O NitrAdine foi o higienizador mais eficaz, apresentando ação antimicrobiana sobre *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*, tanto nos biofilmes isolados como no multiespécies. Em relação ao *S. aureus*, apresentou ação exclusivamente no biofilme isolado.
2. O Cepacol foi eficaz somente na redução de *C. glabrata* no biofilme multiespécies.
3. As soluções de *Ricinus communis* de 2% e 10% apresentaram resultados intermediários nos grupos de *Staphylococcus aureus* (biofilme isolado) e *Candida glabrata* (biofilme multiespécies e isolado).
4. Nenhuma solução higienizadora utilizada neste estudo apresentou ação antimicrobiana em relação à *Candida albicans*.

8. Referências

1. Abere DJ. Post-placement care of complete and removable partial dentures. *Dent Clin North Am.* 1979;23(6):143-51.
2. Albuquerque Jr R, Head TW, Mian H, Ridrigo A, Müller K, Sanches K, Ito IY. Redution of salivar *S. aureus* and mutans group streptococci by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. *Quintessence Int.* 2004;35(8):635-40.
3. Allison DL, Willems HM, Jayatilake JAMS, Bruno VM, Peters BM, Shirtliff ME. *Candida*-bacteria interactions: their impact on human disease. *Microbiol Spectrum.* 2016;4(2):VMBF-0030-2016.
4. Alves D, Costa AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A. Cloreto de cetilpiridínio – revisão de literatura. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2012;53(3):181-9.
5. Andrade IM, Andrade KM, Pisani MX, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Paranhos Hde F. Trial of an experimental castor oil solution for cleaning dentures. *Braz Dent J.* 2014;25(1):43-7.
6. Andrade IM, Cruz PC, Silva CH, Souza RF, Paranhos HF, Candido RC, Marin JM, Souza-Gugelmin MC. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and mutans streptococci in denture biofilm. *Gerodontology.* 2011;28(4):264-70.
7. Andrade IM, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Pisani MX, de Andrade KM, Paranhos HFO. Trial of experimental toothpastes regarding quality for cleaning dentures. *Int J Prosthodont.* 2012;25(2):157-9.
8. André RFG, Andrade IM, Silva-Lovato CH, Parnhos HFO, Pimenta FC, Ito IY. Prevalence of mutans streptococci isolated from complete dentures and their susceptibility to mouthrinses. *Braz Dent J.* 2011;22(1): 62-7.
9. Arruda CNF, Salles MM, Badaró MM, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Paranhos HF. Effect of sodium hypochlorite and *Ricinus communis* solutions on control of denture biofilm: A randomized crossover clinical trial. *J Prosthet Dent.* 2016 Dec 4. pii: S0022-3913(16)30506-6. doi: 10.1016
10. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin Poisoning: A Comprehensive Review. *JAMA.* 2005;294(18):2342-51.

11. Auschill TM, Artweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilm. Arch Oral Biol. 2001;46:471-6.
12. Backenstone, W.H. and Wells, J.G. . Side Effects of Immersion- type Cleansers on the Metal Components of Dentures. J Prosthet Dent.. 1977;3:615-21.
13. Badaró MM. Avaliação clínica e laboratorial de uma solução experimental à base de *Ricinus communis* em comparação ao hipoclorito de sódio para higiene de próteses totais. Ribeirão Preto, 2013. [dissertação de mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
14. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas. Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005;10:E27-9.
15. Bergman B, Hugoson A, Olsson CO. A 25 year longitudinal study of pacientes treated with removable partial dentures. J Oral Rehabil. 1995;22(8):595-9.
16. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. Dent Mater. 1997;13(4):258-69.
17. Borges AH, Pedro FLM, Semenoff TDV, Porto AN, Semenoff-Segundo A, Buzelle SL. Antimicrobial effectiveness of different trademarks mouthwashes with and without alcohol against different organisms: in vitro study. Rev Odonto Ciênc. 2010;25(2):178-81.
18. Budtz-Jorgensen E. Materials and Methods for Cleaning Dentures. J Prosthet Dent 1979;42(6): 619-23.
19. Carr AB, Brown DT. McCracken: Prótese Parcial Removível. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier;2012.
20. Cavalcanti IMG, Del Bel Cury, AA, Jenkinson HF, Nobbs AH. Interactions between Streptococcus oralis, Actinomyces oris, and Candida albicans in the development of multispecies oral microbial biofilms on salivary pellicle. Mol Oral Microbiol. 2017;32(1):60-73.

21. Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, Del-Bel-Cury AA, Silva WJ, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling*. 2016;32(2):123-34.
22. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):377-83.
23. Coimbra FC, Salles MM, De Oliveira VC, Macedo AP, Da Silva CH, Pagnano VO, Paranhos Hde F. Antimicrobial efficacy of complete denture cleansers. *Am J Dent*. 2016;29(3):149-53.
24. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br Dent J* 2007;64(4): 180–9.
25. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agentes. *Clin Antimicrobial Rev*. 1999;12(4):564-82.
26. Cowan MM, Taylor KG, Doyle RJ. Kinetic analysis of *Streptococcus sanguis* adhesion to artificial pellicle. *J Dent Res*. 1986; 65: 1278-83.
27. Desrosiers M, Myntti M, James G. Methods for removing bacterial biofilms: in vitro study using clinical chronic rhinosinusitis specimens. *Am J Rhinol*. 2007; 21(5):527–32.
28. Dhamande MM, Pakhan AJ, Thombare RU, Ghodpage SL. Evaluation of efficacy of commercial denture cleansing agents to reduce the fungal biofilm activity from heat polymerized denture acrylic resin: An in vitro study. *Contemp Clin Dent*. 2012;3(2):168-72.
29. Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *J Prosthet Dent*. 1988;60(4): 467–70.
30. Drake D, Wells J, Ettinger R. Efficacy of denture cleansing agents in an in vitro bacteria-yeast colonization model. *Int J Prosthodont*. 1992;5(3):214–20.

- 31.** Felipucci DNB, Davi LR, Paranhos HF, Bezzon OL, Silva RF, Barbosa Junior F, Pagnano VO. Effect of different cleansers on the weight and ion release of removable partial denture: an in vitro study. *J Appl Oral Sci.* 2011a;19(5):483-7.
- 32.** Felipucci DN, Davi LR, Paranhos HF, Bezzon OL, Silva RF, Pagnano VO. Effect of different cleansers on the surface of removable partial denture. *Braz Dent J.* 2011b;22(5):392-397.
- 33.** Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, Meredith P, Solie C, Deal Chandler N. Evidence-based guidelines for care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontics. *J Prosthodont.* 2011;20:S1-S2.
- 34.** Ferreira CM, Bonifacio KC, Froner IC, Ito IY. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigating solutions in teeth with pulpal necrosis. *Braz Dent J.* 1999;10(1):15-21.
- 35.** Ferreira CM, Rosa OPS, Torres AS, Ferreira FBA, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J.* 2002;13(2):118-22.
- 36.** Ferreira MA, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-Garcia RC, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. *Clin Oral Invest.* 2009;13(2):237-42.
- 37.** Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(4): 221-25.
- 38.** Freitas Fernandes FS, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Filho AP, Straioto FG, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on *Candida* spp. biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *J Prosthet Dent.* 2011;105:51-58.
- 39.** Ito IY, Fröner IC, Mian H, GO C. Castor oil: antimicrobial activity of detergent derived from ricinoleic acid. *J Dent Res.* 1999;78:344.
- 40.** Ito IY, Verril RA, Ribas JP, De Lima SNM, Palamin RV, Campos GM. Efeitos do Cloreto de Cetilpiridíneo na inibição da placa dental. *Odont Moderna.* 1980;7(2):8-23.

41. Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing – the best approach. *Br Dent J*. 1995; 178(11):413-7 .
42. Jeyapalan K, Kumar JK, Azhagarasan NS. Comparative evaluation of the effect of denture cleansers on the surface topography of denture base materials: An in-vitro study. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2015;7(Suppl 2):S548-S553. doi:10.4103/0975-7406.163536.
43. Keyf, F, Gungor, T. Comparison of effects of bleach and cleansing tablet on reflectance and surface changes of a dental alloy used for removable partial dentures. *J Biomater Appl*. 2003;18(1):05-14.
44. Kiesow A; Sarembe S; Pizzey RL; Axe AS; Bradshaw DJ. Material compatibility and antimicrobial activity of consumer products commonly used to clean dentures. *J Prosthet Dent*. 2016;115(2):189-98.
45. Lee D, Howlett J, Pratten J, Mordan N, McDonald A, Wilson M, Ready D. Susceptibility of MRSA biofilms to denture-cleansing agents. *FEMS Microbiology Lett*. 2009;291(2),241-6.
46. Lee HE, Li CY, Chang HW, Yang YH, Wu JH. Effects of different denture cleaning methods to remove *Candida albicans* from acrylic resin denture based material. *J Dent Sci*. 2011;6:216-20.
47. Leite VMF, Pinheiro JB, Pisani MX, Watanabe E, Souza RF, Paranhos HFO, Silva CHL. *In vitro* Antimicrobial Activity of an Experimental Dentifrice Based on *Ricinus communis*. *Braz Dent J*. 2014;25(3):191-6.
48. Li L, Finnegan MB, Özkan S, Kim Y, Lillehoj PB, Ho CM, Lux R, Mito R, Loewy Z, Shi W. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. *Mol Oral Microbiol*. 2010; 25(6):384-90.
49. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbial Rev*. 2000;13(4):547-58.
50. Lucena-Ferreira SC, Cavalcanti IMG, Del Bel Cury AA. Efficacy of Denture Cleansers in Reducing Microbial Counts from Removable Partial Dentures: A Short-Term Clinical Evaluation. *Braz Dent J*. 2013;24(4):353-6.

- 51.** Lucena-Ferreira SC, Ricomini-Filho AP, Silva WJ, Cury JA, Cury AA. Influence of daily immersion in denture cleanser on multispecies biofilm. *Clin Oral Invest.* 2014;18(9):2179-85.
- 52.** Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS.* 2002;110(9):601-10.
- 53.** Marsh, Philip D. Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):441-54.
- 54.** Marsh, PD, Head, DA and Devine, DA. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for treatment. *J Oral Biosci.* 2015;57(4):185-91.
- 55.** Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. *J Prosthet Dent.* 1984;52(2):158-63.
- 56.** Mordenti JJ, Lindstrom RE, Tanzer JM. Activity of sodium ricinoleate against in vitro plaque. *J Pharm Sci.* 1982;71(12):1419-21.
- 57.** Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol.* 31(2):247-56.
- 58.** Nelson-Filho P, Pereira MSS, De Rossi A, Bezerra-da-Silva RA, Mesquita KSF, Queiroz AM, Bezerra-da-Silva LA. Children's toothbrush contamination in day-care centers: how to solve this problem? *Clin Oral Invest.* 2014;18(8):1969-74.
- 59.** Neppelenbroek KH. The importance of daily removal of the denture biofilm for oral and systemic diseases prevention. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(6):547-48.
- 60.** Neto AF, Carreiro AFP, Rizzati-Barbosa. A Prótese parcial removível no contexto da Odontologia atual. *Odontol. Clín Cient.* 2011;10(2):125-8.
- 61.** Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report.* 2000;17(1):215-34.

62. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque - past and recent concerns. J Dent. 1998;26(4):299-304.
63. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. Int J Prosthodont. 1999;12(2):153-9.
64. Nikawa H, Jin C, Makihiro S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. J Oral Rehabil. 2003;30(3):243-50.
65. Paranhos HFO, Bezzon OL, Davi LR, Felipucci DN, Silva CH, Pagnano VO. Effect of cleanser solutions on the color of acrylic resins associated with titanium and nickel-chromium alloys. Braz Oral Res. 2014;28(1):1-7.
66. Paranhos HFO, Lovato Silva CH, Cruz, PC. Métodos de Quantificação de Biofilme em Prótese Total: Revisão da Literatura. Rev Odontol UNESP. 2004;33(4):203-10.
67. Paranhos HFO, Malachias A, Pardini LC. Materiais para limpeza de dentaduras: revisão da literatura. Rev Fac Odontol Lins. 1991;4(2):15-8.
68. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, Ito IY. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed *in vitro* on acrylic resin. J Prosthodont. 2009;18(5):427-31.
69. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM et al. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. J Oral Rehabil. 2007a;34(8):606-12.
70. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Venezian GC, Macedo LD, de Souza RF. Distribution of biofilm on internal and external surfaces of upper complete dentures: the effect of hygiene instruction. Gerodontology. 2007b;24(3):162-8.
71. Peracini A. Soluções higienizadoras de prótese total: avaliação da remoção de biofilme e efeito sobre propriedades da resina acrílica termopolimerizável [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2012.

- 72.** Peracini A, Andrade IM, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J.* 2010a;21(3):247-52.
- 73.** Peracini A, Davi LR, de Queiroz Ribeiro N, de Souza RF, Lovato da Silva CH, de Freitas Oliveira Paranhos H. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. *J Prosthodont Res.* 2010b;54(2):78-83.
- 74.** Pereira CA, Romero RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(3): 341-8.
- 75.** Pereira-Cenci T, Del BelCury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*- associated denture stomatitis: new Insights. *J Appl Oral Sci.* 2008b; 16(2): 86-94.
- 76.** Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008a;53(8):755-64.
- 77.** Pinelli LAP, Montandon AAB, Corbi SCT, Moraes TA, Fais LMG. *Ricinus communis* treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. *J Oral Rehabil.* 2013;40(5):375-80.
- 78.** Pisani MX, Lovato-da-Silva CH, Paranhos HFO, Souza RF, Macedo AP. Evaluation of Experimental Cleanser Solution of *Ricinus communis*: effect on soft denture liner properties. *Gerontology.* 2010;29(2):179-85.
- 79.** Preshaw PM, Walls AWG, Jakubovics NS, Moynihan PJ, Jepson NJA, Loewy Z. Association of removable partial denture use with oral and systemic health. *J Dent* 2011;39(11):711-9.
- 80.** Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995;22(1):1-14.
- 81.** Radford DR, Sweet SP, Challacomb SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent* 1998;26(7):577-83.

- 82.** Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: A role for Candida biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(1):53-9.
- 83.** Salles MM, Oliveira VC, Souza RF, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning – in vitro evaluation. *Braz Oral Res.* 2015;29(1):1-6.
- 84.** Santos ALS, Carvalho IS, Prata JM, Martins MB, Souza LOP, Galdino ACM, Braga-Silva LA, Branquinha MH, Rodrigues SM, Sousa LVNF. Candida Albicans Involvement in Denture-Related Stomatitis: A Serious and Real Clinical Concern. *J Infect Dis Diagn.* 2016;104(1):1-3.
- 85.** Schwindling FS, Rammelsberg P, Stober T. Effect of chemical disinfection on the surface roughness of hard denture base materials: a systematic literature review. *Int J Prosthodont.* 2014;27(3):215-25.
- 86.** Sedrez-Porto JA, Santos MBF, Pereira-Cenci T. Cleaning methods for removable dentures: A critical review of the literature. *Braz Dent Sci.* 2016;19(3):14-22.
- 87.** Semenoff TADV, Semenoff-Segundo A, Biasoli ER. Efetividade antimicrobiana in vitro de enxaguatórios bucais frente aos microrganismos Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa. *Rev. Odonto Ciênc.* 2008; 23(4): 351-54.
- 88.** Sesma N, Takada KS, Lagana DC, Jaeger RG, Azambuja Junior N. Eficiência de métodos caseiros de higienização e limpeza de próteses parciais removíveis. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1991; 53(6):463-8.
- 89.** Sesma N, Morimoto S. Estomatite protética: etiologia, tratamento e aspectos clínicos. *Journal of Biodentistry and Biomaterials.* 2011;2:24-9.
- 90.** Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract.* 2000;1(2):28-41.
- 91.** Sheen SR, Harrison A. Assessment of plaque prevention on dentures using an experimental cleanser. *J Prosthet Dent.* 2000;84(6):594-601.

- 92.** Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. J Prosthodont. 2008a;17(8):627-33.
- 93.** Silva PMB, Porto VC, Bonachella WC. Aspectos periodontais em pacientes usuários de prótese parcial removível. Rev. Odonto Ciênc. 2008b;23(2):297-301.
- 94.** Silva-Lovato CH, Wever B, Adriaens E, Paranhos Hde F, Watanabe E, Pisani MX, et al. Clinical and antimicrobial efficacy of NitrAdine -based disinfecting cleaning tablets in complete denture wearers. J App Oral Sci. 2010;18(6):560-5.
- 95.** Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity. J Med Microbiol. 2001;50(11):940-6.
- 96.** Siqueira DCR. Avaliação comparativa in vivo da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1%, da clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona a 10%, utilizados como soluções irrigadoras em endodontia [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2005.
- 97.** Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. Lett Appl Microbiol. 2012;56(11):14-20.
- 98.** Sreenivasan PK, Mattai J, Nabi N, Xu T, Gaffar A. A simple approach to examine early oral microbial biofilm formation and the effects of treatments. Oral Microbiol Immunol 2004;19(5):297- 302.
- 99.** Sumi Y, Miura H, Sunakawa M, Michiwaki Y, Sakagami N. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. Gerodontology. 2002;19(1):25-9.
- 100.** Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J. Dent. Res. J Dent Res. 2011;90(3):294-303.
- 101.** Takano EH, Busso C, Gonçalves EAL, Chierice GO, Cantazaro-Guimarães SA, Castro-Prado MAA. Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo de mamona (*Ricinus communis*). Cien. Rural. 2007;37(5):1235-40.

- 102.** Taylor R, Maryan C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *J Prosthet Dent.* 1998;80(50):592–7.
- 103.** Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clinical Oral Investigations.* 2013; 17(3): 841–50.
- 104.** Vasconcelos LCS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MCV, Peixoto MHP. *Streptococcus mutans* in denture stomatitis patients under antifungal therapy. *Rev. odonto ciênc.* 2010;25(21):120-25.
- 105.** Verran J, Motteram KL. The effect of adherent oral streptococci on the subsequent adherence of *Candida albicans* to acrylic in vitro. *J Dent.* 1987;15(2):73-6.
- 106.** Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):137–43.
- 107.** Watanabe E, Nascimento AP, Guerreiro-Tanomaru JM, Razaboni AM, de Andrade D, Tanomaru-Filho M. Antiseptic mouthwashes: in vitro antibacterial activity. *Acta Odontol Latinoam.* 2015;28(2):180-4
- 108.** Watanabe E, Tanomaru JM, Nascimento AP, Matoba-Junior F, Tanomaru-Filho M, Yoko Ito I. Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride –based mounth washes against *Staphylococcus aureus* an in vitro study. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(4):275-9.
- 109.** Watanabe E, Razaboni AM, Beraldo CC, Giordani AT, Andrade D. Determinação in vitro da atividade antibacteriana de detergente de mamona contra bactérias hospitalares. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2013;34(1):59-62.
- 110.** Whitehead SA; Shearer AC; Watts DC; Wilson NH. Comparison of two stylus methods for measuring surface texture. *Dent Mater.* 1999;15(2):79-86.