Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Materiais Dentários e Prótese

MAURÍCIO MALHEIROS BADARÓ

Avaliação clínica e laboratorial do efeito de soluções de Hipoclorito de sódio, Cloramina T e *Ricinus communis* sobre espécies de *Candida* identificadas no biofilme de próteses totais e palato de indivíduos desdentados totais

Ribeirão Preto

2017

MAURÍCIO MALHEIROS BADARÓ

Avaliação clínica e laboratorial do efeito de soluções de Hipoclorito de sódio, Cloramina T e *Ricinus communis* sobre espécies de *Candida* identificadas no biofilme de próteses totais e palato de indivíduos desdentados totais

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor, junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Reabilitação Oral), Departamento de Materiais Dentários e Prótese.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador(a): Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva.

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do *Campus* USP – Ribeirão Preto

Badaró, Maurício Malheiros

Avaliação clínica e laboratorial do efeito de soluções de Hipoclorito de sódio, Cloramina T e *Ricinus communis* sobre espécies de *Candida* identificadas no biofilme de próteses totais e palato de indivíduos desdentados totais. Ribeirão Preto, 2017.

153p. : il.; 30 cm

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

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

Orientador(a): Silva-Lovato, Cláudia Helena.

1. Prótese total. 2. Biofilmes. 3. Desinfetantes. 4. Candidíase. 5. Fatores de virulência. 6. *Candida*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAURÍCIO MALHEIROS BADARÓ

Avaliação clínica e laboratorial do efeito de soluções de Hipoclorito de sódio, Cloramina T e *Ricinus communis* sobre espécies de *Candida* identificadas no biofilme de próteses totais e palato de indivíduos desdentados totais

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Data da defesa: ____/____/ 2017

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À Deus e Nossa Senhora, por permitirem realizar meus sonhos sempre me protegendo, guiando, dando força e me iluminando.

Aos meus pais, Júlia e Geraldo, que são minha motivação de vida, fonte de amor constante, infinito apoio, estímulo, carinho e compreensão. Vocês fazem parte dessa conquista e reafirmo meu amor eterno!

Aos meus familiares Tia Alice e Juliatti pela força, carinho e torcida por cada momento da minha vida, dedico mais uma vitória a vocês.

Aos meus amados, Tia Lolo (in memoriam) e Tio Fialho (in memoriam), que sempre torceram por mim e que estão vivos no amor que guardo em meu coração por vocês, dedico mais esta conquista.

Aos demais entes queridos da minha família.

À todos que colaboraram para tornar possível a realização desse trabalho.

Agradecimento Especial

À Profª Drª Cláudia Helena Lovato da Silva, minha orientadora da pós-graduação, meu exemplo de ser humano, profissional, de virtudes e princípios, que será sempre lembrada com grande carinho e gratidão por todo meu caminho de vida. Só tenho elogios!!! Muito obrigado pelos ensinamentos, oportunidades, compreensão, paciência, amizade e dedicação. Tudo que conquistei foi devido sua orientação, agradecimentos eternos a você Professora!!!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da diretora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, por ter me acolhido, permitido e contribuído para minha formação profissional e aprendizado.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e depois CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa e principalmente oportunidade para elaboração deste trabalho (processo nº: 142219/2015-0).

À Curaprox por ter doado as escovas que compuseram os kits de higiene dados aos participantes da pesquisa. Muito obrigado!!!

Aos anteriores e atuais Chefes do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva e Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza, obrigado por todos os esforços em tornar o programa pelo qual me acolheu sempre melhor e mais respeitado.

Aos atuais coordenadores da Pós-Graduação na área de Reabilitação Oral, Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro e Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida Antunes, pelos esforços e trabalhos extras em nome do nosso curso, que direta e indiretamente promovem a melhora de todos os alunos.

*À anterior coordenadora da Pós-Graduação na área de Reabilitação Oral, **Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza**, por tudo que foi feito desde o meu mestrado e início de doutorado, assim como pela amizade e incentivo.*

*À **Profª Drª Helena de Freitas Oliveira Paranhos**, sempre muito educada e querida, agradeço pelas oportunidades, confiança, ensinamentos, incentivos e suporte. Minha admiração está sempre em constante ascensão! Muito obrigado por tudo!!!*

*Ao **Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza**, por confiar em mim oportunidades desde meu início na pós-graduação, obrigado pela confiança, ensinamentos, amizade e suporte.*

*Aos docentes, **Prof. Dr. Cássio do Nascimento** e **Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza** por toda ajuda, incentivos, ensinamentos e amizade.*

*Ao **Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice** (Instituto de Química de São Carlos) e funcionários (**Salvador e Toninho**) pelo fornecimento da solução de *Ricinus communis* para elaboração do trabalho e por sempre nos receber bem em seu departamento.*

*Aos **Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela contribuição e ajuda para minha formação como mestre e doutor.*

Às Funcionárias Regiane de C. Tirado Damasceno, Fernanda Talita de Freitas, Ana Paula Xavier, e Denise Martins Fontes Gonçalves pela disponibilidade, informações, paciência, ajuda ao longo do curso e amizade.

À Viviane de Cássia Oliveira pelo imenso ensino, esforço, ajuda e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Você foi essencial para realização de tudo. Muito obrigado de coração!!!

À Ana Paula Macedo pela ajuda no processamento dos dados e estatística deste trabalho, assim como disponibilidade, confiança, informações, paciência, ajuda ao longo do curso e amizade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, Emerson de Souza Santos e Laís Balico (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FCFRP) por permitirem realizar parte do experimento no Laboratório de Bioquímica Clínica, agradeço em especial a disponibilidade, paciência e ajuda.

Ao Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa por permitir realizar parte do meu experimento utilizando o laboratório de sua responsabilidade.

À Paula Barbugli e Chaiene Evelyn Zago (Faculdade de Odontologia de Araraquara/ UNESP) pelas informações e ajudas dadas na compreensão e realização de parte da metodologia deste trabalho, assim como disponibilidade e paciência.

Ao Silva-Lovato team no desenvolvimento da pesquisa, Frank Lucarini Bueno, Lais Ranieri Makrakis, Raíssa Macaroff Arnez, Camila Borba Araújo, Edward Wagner Sasaki, Letícia de Sá Evelin e Viviane de Cássia Oliveira, minha imensa gratidão no empenho, ajuda, motivação, força de vontade, amizade e dedicação em todas as etapas do trabalho. Somos uma família!!!

À família do laboratório, parceiros e amigos, Carolina Noronha Ferraz de Arruda, Lascívia Millena Manguiera Rocha, Marcella Moreira Salles, Tatiana Ramirez Cunha, Maria Paula Della Vecchia, Adriana Barbosa Ribeiro, Marina Vomero, Priscilla N. Raile, Patrícia A. Curyolo, Nathália Ramos, Vanessa M. F. Leite Fernandes, Juliana B. Pinheiro, Flávia C. T. Coimbra, Cláudia Macedo, Viviane de Cássia Oliveira, Luciana C. Costa, Danilo Sorgini e Daniela G. Ribeiro. Obrigado por cada momento, companheirismo, ajudas, compreensão, risos, conversas,..., por tudo!!!! Não daria nada certo sem a convivência diária com vocês!!!

Aos grandes amigos que a pós-graduação me deu Raniel Peixoto Fernandes, Bruna Santos T. Tonin, Frank Lucarini, Marcela Moreira Salles, Carolina Noronha Ferraz de Arruda, Lascívia Millena M. Rocha, Suleima do Vale e Thalisson Saymo.

À equipe do DAPE, onde convivi ao longo de toda a minha pós-graduação, só tenho agradecer pela ótima convivência, amizade, aprendizados e consideração, em especial Ditinha, Cristiano Nakao, Profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta, Profª Drª Marilena Chinali Komesu, Fátima e pacientes que atendi.

*À todos os pacientes que participaram da pesquisa, colaborando com cada etapa do trabalho e ao **Hermano Teixeira Machado**, pela ajuda, paciência e ensinamento ao realizar as fotografias do trabalho.*

*Aos funcionários **Seu Zé, Verinha, Karina, Silvinha e Fernando**, sempre muito prestativos, receptivos e amigos, muito obrigado, sem a ajuda de vocês seria mais difícil realizar esta pesquisa.*

*Aos alunos da **graduação** por permitirem trabalhar com seus pacientes durante os horários de clínica, e sempre que possível ajudarem quando precisei. Obrigado !!!!*

*À Profa. Dra. **Sueli da Silva Kataoka** e Profa. Dra. **Marizeli Viana de Aragão Araújo**, da minha graduação, pelo incentivo e por terem me ajudado a construir toda minha base científica e continuarem sendo minhas referências profissionais.*

*Aos Professores do Centrinho – HRAC/USP (**José Fernando Scarelli Lopes, João Henrique N. Pinto, Mônica M. W. Lopes, Rosângela G. Cerigatto, Rafael Tavano, Simone Soares e Caio M. Figueiredo**) e funcionários (**Maria Emília Dáliaqua, Adriana R. C. Leite, Ivone Macedo, Elisa Maria da Silva, Rosângela, Maurício e Seu Hélio**) por serem minha família no período em que estive em Bauru e pela ajuda, amizade, incentivo e ensinamentos.*

*Aos Amigos que foram minha família em Ribeirão Preto: **Pedro Ianhez, Mariângela Ianhez e Edgar Ianhez**.*

*Aos Amigos que sempre estiveram do meu lado, principalmente nos períodos longe de casa, em todos os momentos, torcendo, incentivando e comemorando minhas vitórias, **Fabiola Azevedo, Paula Karam e Priscilla Gonçalves.***

*À todos os **amigos e colegas da Pós-Graduação**, pela amizade, companheirismo, troca de experiências e brincadeiras.*

À todos que colaboraram para realização desse trabalho e dos momentos vivenciados ao longo do doutorado.

Muito Obrigado!!!!

Resumo

BADARÓ, M.M. **Avaliação clínica e laboratorial do efeito de soluções de Hipoclorito de sódio, Cloramina T e *Ricinus communis* sobre espécies de *Candida* identificadas no biofilme de próteses totais e palato de indivíduos desdentados totais.** Ribeirão Preto, 2017. 153p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Este estudo clínico-laboratorial identificou as espécies de *Candida* do palato e prótese de indivíduos desdentados totais com estomatite relacionada à prótese (ERP) e avaliou o efeito de soluções desinfetantes para higiene de próteses totais sobre *Candida* spp.. Sessenta participantes foram distribuídos aleatoriamente em 04 grupos paralelos (n=15); orientados a escovar as próteses e o palato 3 vezes ao dia e imergi-las nas soluções salina (C – controle), Hipoclorito de sódio a 0,25% (HS0,25%), *Ricinus communis* a 10% (RC10%) ou Cloramina T a 0,5% (CT0,5%) por 20 minutos. Amostras de biofilme foram coletadas da prótese e palato no *Baseline*, após 7 e 37 dias do uso das soluções e semeadas em meio CHROMagar *Candida*. Após período de incubação foi realizada a identificação presuntiva, verificação da incidência e quantificação de crescimento das espécies de *Candida* (contagem de UFC). Cepas ATCC das espécies mais incidentes clinicamente foram avaliadas no estudo laboratorial. Biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram formados sobre espécimes em resina acrílica termopolimerizável e imersos nas soluções por 20 minutos. Água destilada foi utilizada como controle. As variáveis de resposta foram crescimento de colônias (contagem de UFC), metabolismo celular (método de XTT), produção de enzimas hidrolíticas (kits específicos), formação de hifas (contagem de células em câmara de Neubauer) e quantificação de células vivas (microscopia de epifluorescência). A capacidade de remoção de biofilme pelas soluções também foi avaliada por meio de microscopia de epifluorescência. Para o estudo clínico, análises descritivas foram utilizadas para interpretação dos dados quanto às características sociodemográficas da amostra, identificação e incidência das *Candida* spp. Os resultados de crescimento celular (UFC) foram analisados pelos Testes Kruskal-Wallis e Friedman. Para o estudo laboratorial, os resultados foram analisados por teste Anova (One-way) e Tukey (capacidade de crescimento e metabolismo celular de *C. albicans* e *C. tropicalis*), teste de Kruskal-Wallis (metabolismo celular de *C. glabrata*; produção de enzimas hidrolíticas; formação de hifas; capacidade de remoção de biofilme) e teste de Wilcoxon (comparação entre quantidade de biofilme vivo e biofilme total). Empregou-se um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). As espécies mais incidentes foram *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. O HS 0,25% reduziu a incidência

das três espécies na prótese e palato nos períodos de 7 e 37 dias; o CT 0,5% promoveu redução de *Candida* spp. somente nas próteses totais. O *R. communis* diminuiu a incidência de *C. tropicalis* em ambos os sítios de coleta. Para contagem de UFC, o HS 0,25% e CT 0,5% causaram redução significativa para cepas clínicas e ATCC. O *R. communis*, in vitro, reduziu a quantidade de UFC de *C. glabrata*. O HS 0,25% obteve os melhores valores contra atividade metabólica, formação de hifas, manutenção de células vivas e remoção do biofilme das espécies de *Candida*. As soluções de RC 10% e CT 0,5% causaram diminuição da atividade metabólica. Não houve diferença significativa na produção de proteinase por *C. albicans* e *C. tropicalis* após exposição às diferentes soluções desinfetantes, com exceção da *C. glabrata*, em que todas as soluções causaram aumento significativo da produção desta enzima. As soluções não influenciaram a produção de fosfolipase. A CT 0,5% e RC 10% apresentaram resultados intermediários para manutenção de células vivas. A Cloramina T foi mais eficiente que o *R. communis* para remoção do biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis* e menos eficiente para remoção de biofilme de *C. glabrata*. As soluções de Hipoclorito de sódio a 0,25% e Cloramina T a 0,5% apresentaram os melhores resultados como solução de imersão frente às variáveis estudadas, podendo ser indicadas para uso clínico como desinfetantes para próteses totais.

Palavras-chave: 1. Prótese total 2. Biofilmes 3. Desinfetantes 4. Candidíase 5. Fatores de virulência 6. *Candida*

Abstract

BADARÓ, M.M. **Clinical and laboratorial evaluation of the effect of Sodium hypochlorite, Chloramine T e *Ricinus communis* solutions in *Candida* species identified in the biofilm of total prostheses and palate of total edentulous individuals.** Ribeirão Preto, 2017. 153p. Thesis (PhD in Oral Rehabilitation). School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

ABSTRACT

This clinical-laboratory study identified the *Candida* species from the palate and complete dentures of edentulous individuals with prosthesis-related stomatitis (PRS) and evaluated the effect of disinfectant solutions for denture hygiene on *Candida* spp. Sixty participants were randomly assigned in 04 parallel groups (n = 15); They were oriented to brush their prostheses and the palate 3 times a day and immerse them in saline solution (C-control), 0.25% Sodium hypochlorite (HS0.25%), 10% *Ricinus communis* (RC10%) or 0.5% Chloramine T (CT 0.5%) for 20 minutes. Biofilm samples were collected from the prosthesis and palate in the baseline, after 7 and 37 days of use of the solutions and seeded in CHROMagar *Candida* medium. After incubation period, the presumptive identification, incidence verification and quantification of *Candida* species growth (CFU count) were performed. ATCC strains of the most clinically incident species were evaluated in the laboratory study. *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* biofilms were formed on heat-polymerised acrylic resin specimens and immersed in the solutions for 20 minutes. Distilled water was used as control. The response variables were colony growth (UFC count), cell metabolism (XTT method), production of hydrolytic enzymes (specific kits), formation of hyphae (counting cells in Newbauer's chamber) and quantification of live cells (epifluorescence microscopy). The ability of biofilm removal by the solutions was also evaluated by means of epifluorescence microscopy. For the clinical study, descriptive analyzes were used to interpret the data regarding the sociodemographic characteristics of the sample, identification and incidence of *Candida* spp. The cell growth results (CFU) were analyzed by the Kruskal-Wallis and Friedman tests. For the laboratorial study, the results were analyzed by the Anova (One-way) and Tukey test (growth capacity and cellular metabolism of *C. albicans* and *C. tropicalis*), Kruskal-Wallis test (cellular metabolism of *C. glabrata*; hydrolytic enzymes production; formation of hyphae; ability to remove biofilm) and Wilcoxon's test (comparison of the amount of live biofilm and total biofilm). A confidence level of 95% ($\alpha = 0.05$) was used. The most incident species were *C. albicans*, followed by *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. HS 0.25% reduced the incidence of the three species on the prosthesis and palate in the periods of 7 and 37 days; CT 0.5% promoted reduction of *Candida* spp. only in dentures. *R. communis* decreased the incidence of *C. tropicalis* in both collection sites. For CFU counts, HS 0.25% and CT 0.5% caused significant reduction for clinical strains and ATCC. *R. communis*, in vitro, reduced the amount of CFU of *C. glabrata*. The HS 0.25% obtained the best values compared to the metabolic activity, hyphae formation, maintenance of living cells and removal of the biofilm of *Candida* species. The solutions of RC 10% and CT 0.5% caused the decrease in the metabolic activity. There was no significant difference in proteinase production by *C. albicans* and *C. tropicalis* after exposure to different disinfectant solutions, except *C. glabrata*, in which all solutions caused a significant increase

in the production of this enzyme. The solutions did not influence phospholipase production. A CT 0.5% and RC 10% presented intermediate results for the maintenance of living cells. Chloramine T was more efficient than *R. communis* for biofilm removal from *C. albicans* and *C. tropicalis*; and less efficient for biofilm removal from *C. glabrata*. The solutions of 0.25% Sodium Hypochlorite and 0.5% Chloramine T presented the best results as immersion solution compared to the studied variables and can be prescribed for clinical use as disinfectants for total dentures.

Keywords: 1. Denture 2. Biofilms 3. Disinfectants 4. Candidiasis 5. Virulence Factors 6. *Candida*

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	25
2 PROPOSIÇÃO	35
Objetivo geral.....	37
Objetivos específicos	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Delineamento do estudo.....	41
3.2. Estudo in vivo	43
3.2.1. Seleção da amostra.....	43
3.2.2. Critérios de inclusão	43
3.2.3. Critérios de exclusão.....	44
3.2.4. Formação dos grupos e Intervenção – Protocolo de higiene	45
3.2.5. Controle dos vieses	46
3.2.6. Coleta do biofilme da prótese total	47
3.2.7. Coleta do biofilme do palato.....	50
3.2.8. Semeadura das amostras	50
3.2.9. Identificação de <i>Candida</i> spp e avaliação do crescimento microbiano	51
3.3. Estudo in vitro	52
3.3.1. Confecção dos espécimes	52
3.3.2. Formação dos grupos	54
3.3.3. Esterilização dos espécimes.....	55
3.3.4. Formação do biofilme de <i>Candida</i> spp.....	55
3.3.5. Desinfecção dos espécimes.....	56
3.3.6. Avaliação do crescimento microbiano.....	57
3.3.7. Avaliação do metabolismo celular.....	58
3.3.8. Avaliação da produção de proteinase e fosfolipase	59
3.3.9. Avaliação da formação de hifas	62
3.3.10. Quantificação do biofilme e de células vivas	63
3.4. Análise dos dados.....	65
4 RESULTADOS	67
4.1. Estudo in vivo	69

4.1.1 Dados sociodemográficos	69
4.1.2 Identificação das espécies de <i>Candida</i> isoladas do palato e prótese de indivíduos desdentados totais com estomatite relacionada à prótese	71
4.1.3 Efeito das soluções sobre a incidência de <i>Candida</i> spp. no palato e prótese de indivíduos desdentados totais com estomatite relacionada à prótese.	72
4.1.4 Avaliação do efeito das soluções desinfetantes sobre o crescimento das espécies de <i>Candida</i>	73
4.2. Estudo in vitro	77
4.2.1 Efeito das soluções sobre o crescimento microbiano das espécies de <i>Candida</i> ..	77
4.2.2 Efeito das soluções desinfetantes sobre o metabolismo celular	78
4.2.3 Efeito das soluções desinfetantes sobre a produção de enzimas hidrolíticas.....	79
Proteinase	79
Fosfolipase	80
4.2.4 Efeito das soluções desinfetantes sobre a formação de hifas.....	81
4.2.5 Efeito das soluções quanto à capacidade de remoção do biofilme e manutenção de células vivas	81
5 DISCUSSÃO	89
5.1 Estudo in vivo	91
5.2 Estudo in vitro.....	95
6 CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICES	123
ANEXOS	147

1. Introdução

A ciência odontológica tem apresentado consideráveis avanços com amplo enfoque em medidas preventivas e maior garantia de acesso aos serviços. Naturalmente, a manutenção e cuidados com os elementos dentários garantem um maior período de permanência na cavidade bucal. No entanto, a epidemiologia do edentulismo ainda é extremamente significativa, em especial para os indivíduos idosos (Gendreau; Loewy, 2011). No Brasil, a parcela populacional que necessita de algum tipo de prótese corresponde a 68,8% dos adultos, sendo que 41,3% possuem indicação de prótese parcial e, em 1,3% dos casos, há necessidade de reabilitação com prótese total em pelo menos um maxilar (Projeto SBBrasil, 2010), sendo que entre os idosos com faixa etária de 65 a 74 anos, 23,9% carecem de prótese total em pelo menos um maxilar e 15,4% necessitam de prótese total dupla (Brasil, 2011). Esses dados reafirmam que o perfil epidemiológico de saúde bucal na população idosa ainda é crítico e exige maior atenção.

Analizando o cenário mundial verifica-se que a redução aparente do edentulismo em 10% por década não implicaria na diminuição das taxas de edentulismo nos Estados Unidos, uma vez que concomitantemente ocorre o aumento do crescimento populacional dos adultos com faixa etária superior a 55 anos. Em 2020, a população desdentada nos Estados Unidos atingiria cerca de 37.900.000, devido ao aumento da expectativa de vida da população (Douglas et al., 2002). Kassebaum et al. (2014), verificaram em um estudo de meta-análise, que a incidência global do edentulismo total reduziu de 4,4% para 4,1% no período entre 1990 e 2010. No entanto, Felton (2016) afirmou que este fato não elimina a necessidade de estudos direcionados às dentaduras completas, especialmente nos Estados Unidos, uma vez que a expectativa de vida é de 78,8 anos. Segundo o autor, a perda dos dentes está associada às comorbidades sistêmicas devido ao aumento de risco para deficiências nutricionais e obesidade, doença obstrutiva pulmonar crônica, câncer de cabeça e pescoço, declínio da função cognitiva, doença cardiovascular, pneumonia em pacientes hospitalizados em função de inadequada manutenção das próteses e mortalidade em função da não reposição dental. O uso de próteses adequadas pode ajudar na proteção contra alguns tipos de doenças e é necessário educar os pacientes e cuidadores para o desfecho desastroso da perda dental e da pobre qualidade das próteses em longo prazo.

A definição de prótese total consiste em tratamento reabilitador amplamente utilizado para reposição total dos dentes inferiores, superiores ou ambos, devolvendo aos indivíduos, função, estética e conforto. Entretanto, na cavidade bucal, qualquer superfície, natural ou sintética, torna-se passível de recobrimento por um precipitado de

glicoproteínas salivares e imunoglobulinas (0,5 a 1,5 µm de espessura) que possibilitam a aderência de detritos orais (mucina, partículas de alimentos e células epiteliais descamadas) e micro-organismos que dão origem ao biofilme (Shay, 2000). Os micro-organismos em biofilmes vivem em uma matriz auto-secretada de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas, que constituem um ambiente imediato, formado principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, proporcionando estabilidade mecânica ao biofilme e intervindo na adesão às superfícies, formando uma rede polimérica coesiva e tridimensional que interconecta e imobiliza as células do biofilme (Flemming, Wingender, 2010). Sendo assim, a prótese total favorece a deposição de biofilme com uma organização complexa de bactérias, fungos (maioria *Candida* spp.) e células epiteliais descamadas (Mukherjee; Chandra, 2004).

Como visto, o biofilme corresponde a uma densa camada microbiana, constituída por uma quantidade superior a 10^{11} micro-organismos/grama, associados aos seus produtos metabólicos. A principal diferença na composição da microbiota do biofilme de próteses totais para as de origem dentária consiste no aumento da quantidade de *Candida* spp., importante fator etiológico da estomatite relacionada à prótese (Nikawa et al., 1998), caracterizada clinicamente pela inflamação e eritema da mucosa recoberta pelos aparelhos protéticos, sendo muitas vezes, assintomática. Em alguns casos há relatos de dor, prurido e/ou queimação da região acometida, podendo ser diagnosticado durante o exame clínico (Zissis et al., 2000; Gendreau; Loewy, 2011).

De acordo com Gendreau e Loewy (2011), há uma relação de risco direta entre uso da prótese, biofilme e o desenvolvimento da estomatite relacionada à prótese (ERP). Esses autores verificaram uma prevalência de ERP entre 15% e 70% dos usuários de prótese total. Loster et al. (2012) encontraram uma prevalência de 58,54% e os autores chamam atenção para o fato de que muitos indivíduos que utilizam próteses não sabem que possuem a infecção, podendo agravar enfermidades sistêmicas como doença pulmonar obstrutiva crônica (Przybyłowska et al., 2015), endocardite bacteriana, pneumonia por aspiração e infecção gastro-intestinal (Coulthwaite; Verran, 2007). Em situações de imunossupressão decorrentes de diabetes, câncer ou AIDS, estas infecções podem tornar-se ainda mais graves pela exacerbação da patogenicidade de espécies de *Candida* (Ha; White, 1999; Haynes, 2001; Hossain et al., 2003; Coenye et al., 2011; Miceli et al., 2011; Salerno et al., 2011; De Luca et al., 2012), uma vez que possuem flexibilidade na capacidade adaptativa perante mudanças ambientais (Gendreau; Loewy, 2011).

Embora a etiologia da estomatite relacionada à prótese seja multifatorial, a capacidade de *Candida* spp. em aderir à resina da base protética e formar biofilmes estruturados, tem sido considerada um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento da doença (Budtz-Jorgensen, 1974; Marcos-Arias et al., 2009; Abaci et al., 2010; Hilgert et al., 2016). Atualmente inúmeras espécies de *Candida* são conhecidas e as mais frequentemente isoladas (50 a 70%) a partir do trato gastrointestinal humano são *Candida albicans*, seguida de outras espécies tais como, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Zaremba et al., 2006; De Rossi et al., 2011) *C. dubliniensis*, *C. krusei* (Haynes, 2001), *C. guilliermondii* e *C. rugosa* (Pfaller et al., 2010).

A capacidade de adaptação de *Candida* spp. sob condições distintas decorre de sua expressão gênica e de fatores de virulência que possibilitam a sobrevivência e replicação das espécies e consequentemente, a progressão de infecções no hospedeiro (Calderone; Fonzi, 2001; Haynes, 2001; De Rossi et al., 2011; Nasution, 2013). Os fatores de virulência evidenciam-se a partir da manifestação clínica, localização, estágio da infecção e resposta do hospedeiro acometido.

São considerados fatores de virulência a atividade extracelular decorrente de enzimas (proteínases e fosfolipases), produção de biofilme (Calderone; Fonzi, 2001; Naglik et al., 2003; Nailis et al., 2010), as alterações fenotípicas e morfológicas (transformação de blastoconídios para pseudohifas e hifas) e a adesão do micro-organismo ao hospedeiro (Lyon; Resende, 2006; Hua et al., 2009; Naglik et al., 2011).

A produção de enzimas, tais como proteínases e fosfolipases, é responsável por desencadear disfunções ou mesmo rupturas da membrana celular que permitem ao fungo atravessar o epitélio do hospedeiro e executar sua adesão (Ghannoum, 2000; Naglik et al., 2003; Lyon; Resende, 2006). Kuriyama et al. (2003) afirmaram que a atividade das proteínases de *C. albicans* em pacientes com estomatite relacionada à prótese é maior quando comparada a indivíduos saudáveis. A progressão da infecção oportunista depende diretamente da capacidade inicial de adesão do micro-organismo ao tecido do hospedeiro (Costa et al., 2010; De Luca et al., 2012). Portanto, as produções de fosfolipases e proteínases em *Candida* spp. são consideradas importantes parâmetros na distinção de cepas patogênicas invasivas de cepas colonizadoras não invasivas (Khater; Al-Nory, 2014).

O dimorfismo que demonstra a flexibilidade adaptativa de algumas espécies de *Candida* em exposição a condições ambientais distintas e/ou variantes (temperatura; pH;

concentração de CO₂; fontes de carbono) ocorre com a diferenciação da forma leveduriforme (unicelular) para a filamentosa, com a formação de hifas ou pseudohifas (Karkowska-Kuleta et al., 2009; De Rossi et al., 2011) que está relacionada ao aumento da capacidade nutricional, adesão (De Rossi et al., 2011) e invasão ao tecido do hospedeiro (Yang et al., 2014).

O biofilme assume maior significância clínica quando suas comunidades microbianas passam a expressar resistência aos agentes antimicrobianos, explicando (em parte) a permanência de bactérias e fungos patogênicos depois de adequada terapia antimicrobiana. Numerosos agentes antimicrobianos têm sido testados contra os biofilmes. Eles abrangem, desde oxidantes não específicos (tais como clorina) a antibióticos específicos (como anfotericina B) (Mukherjee; Chandra, 2004).

O controle da estomatite relacionada à prótese pode ser realizado com o uso de antifúngicos (Nistatina, Miconazol ou Fluconazol) e/ou adequada higiene das próteses e cavidade bucal. A utilização prolongada de antifúngico pode causar efeitos hepato e nefrotóxicos e quando o tratamento é suspenso ocorre a recidiva da inflamação em função da recolonização por *Candida* spp. da mucosa do palato, devido a não erradicação dos fungos que se aderem à superfície protética fazendo desta um reservatório de micro-organismos.

Assim, considerando a dificuldade de restabelecimento da saúde quando da presença de infecções causadas pelas espécies de *Candida* e sabendo que as infecções podem ser potencializadas na presença de uma inadequada higienização de aparelhos protéticos, torna-se evidente a necessidade de prevenção da doença e consequentemente do estabelecimento de um eficiente protocolo de higienização com viabilidade clínica, reduzidos custos e de fácil manuseio (Sartori et al., 2006; Karkowska-Kuleta et al., 2009, Sanita et al., 2012; Kabawat et al., 2014).

A higiene das próteses pode ser realizada por métodos mecânicos, químicos ou associação de ambos. Nos mecânicos se enquadram a escovação (com água, sabão, dentifrícios ou abrasivos) e ultrassom, sendo que a escovação com escova dental e dentifrício é o mais difundido tornando-se uma prática comum de higiene oral.

Quanto ao método químico, este consiste na imersão da prótese em substâncias classificadas a partir de seus componentes e mecanismo de ação, as quais podem ser hipocloritos, peróxidos, peróxidos neutros com enzimas, enzimas, álcoois, ácidos, drogas brutas e enxaguatórios bucais (Nikawa et al., 2009; Shay, 2000). Como a má higienização da prótese está relacionada com a colonização por *Candida*, soluções

desinfetantes têm sido propostas como um método eficaz na prevenção da ERP (Ferreira et al., 2009; Arruda et al., 2016; Badaró et al., 2016b) sendo que tem sido preconizada (Keng; Lim, 1996; Nikawa et al., 1999; Paranhos et al., 2007) a associação destes dois métodos, mecânico e químico como um protocolo eficiente. A utilização de agentes de limpeza em associação ao método de escovação provou ser efetivo para reduzir biofilme de *C. albicans* (Pellizaro et al., 2012). Em acréscimo, associado à higiene das próteses, a escovação do palato deve ser indicada, uma vez que contribui para a redução do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida* advindas da mucosa palatal (Emami et al., 2007; Kabawat et al., 2014) e da extensão da inflamação, uma vez que promove direta remoção do biofilme e estimula a circulação e fluxo salivar local (Kabawat et al., 2014).

A literatura é rica em estudos que avaliam o efeito das soluções de imersão quanto à ação antimicrobiana, capacidade de remoção do biofilme de próteses removíveis e efeitos deletérios sobre a resina acrílica, sendo que os Peróxidos alcalinos e o Hipoclorito de sódio são os mais comumente estudados por apresentarem ação bactericida e fungicida (Shay, 2000; Barnabé et al., 2004; Yilmaz et al., 2005; Buegers et al., 2008; Rossato et al., 2011; Pellizaro et al., 2012; Altieri et al., 2013; Paranhos et al., 2013; Al-Saadi, 2014; Andrade et al., 2014; Kurtulmus-Yilmaz; Deniz, 2014; Oliveria et al., 2014; Salloum, 2014; Yildirim-Bicer et al., 2014; Gama et al., 2015; Rodriguez Acosta et al., 2015; Salles et al., 2015a e 2015b; Arruda et al., 2016; Badaró et al., 2016b).

As concentrações comumente estudadas do **Hipoclorito de sódio são 5,25%** (Al-Saadi, 2014; Salloum, 2014), **2%** (Gama et al., 2015; Karakis et al., 2016), **1%** (Pisani et al., 2010b; Orsi et al., 2011; Pellizaro et al., 2012; Altieri et al., 2013; Yildirim-Bicer et al., 2014; Rodriguez Acosta et al., 2015) e **0,5%** (Kurtulmus-Yilmaz; Deniz, 2014; Salles et al., 2015a e 2015b; Badaró et al., 2016a e 2016b). No entanto, o Hipoclorito de sódio apresenta desvantagens como alteração de propriedades físicas e mecânicas da resina acrílica e efeitos corrosivos sobre os materiais metálicos de próteses parciais removíveis (Buegers et al., 2008; Davi et al., 2010; Felton et al., 2011; Pisani et al., 2012a; Badaró et al., 2016a, Karakis et al., 2016) que estão relacionadas às concentrações empregadas e modo de utilização. Apesar disso, o Hipoclorito de sódio é considerado como padrão de comparação em muitos dos estudos devido sua ótima ação antimicrobiana (Pellizaro et al., 2012; Altieri et al., 2013; Al-Saadi, 2014; Oliveria et al., 2014; Yildirim-Bicer et al., 2014; Gama et al., 2015;

Rodriguez Acosta et al., 2015; Salles et al., 2015a e 2015b; Badaró et al., 2016b) e custo acessível para uso diário. É aceito pela American Dental Association – ADA, como agente para higienização e desinfecção de dispositivos protéticos (Fernandes et al., 2013). Verifica-se porém, que ainda não há um consenso em relação à concentração e tempo de imersão para o Hipoclorito. Além disso, embora sejam escassos os estudos ou relatos de caso sobre o efeito irritante (Hostynek et al., 1990; Sasseville et al., 1999; Dandakis et al., 2000; Crincoli et al., 2008; Quirce; Barranco, 2010), não é raro, na prática clínica, encontrar pacientes com relatos de alergia ao Hipoclorito de sódio. Portanto, estudos que avaliem esta solução em concentrações menores que possam manter sua capacidade antimicrobiana com menores efeitos deletérios aos materiais constituintes das próteses (Salles et al., 2015a e 2015b; Arruda et al., 2016; Badaró et al., 2016a e 2016b; Bueno, 2016) e que não exponham os usuários a riscos, ainda são necessários.

Outros agentes desinfetantes estudados e que merecem destaque, são as soluções de *R. communis* (Pisani et al., 2010b, 2012a e 2012b; Pinelli et al., 2013; Andrade et al., 2014; Leite et al., 2014; Segundo et al., 2014; Leite, 2015; Salles et al., 2015a e 2015b; Arruda et al., 2016; Badaró et al., 2016a e 2016b; Bueno, 2016) e Cloramina T (Pitten; Kramer, 1999; Panzeri et al., 2009; Pisani et al., 2010a; Tirapelli et al., 2010; de Andrade et al., 2012; Leite, 2015; Bueno, 2016).

O óleo de *R. communis* é utilizado desde a Antiguidade e tem apresentado avanços nas pesquisas médicas e odontológicas. Os materiais derivados do *Ricinus communis* têm sido empregados para o reparo de defeitos intraósseos e reconstrução óssea, preenchimento de alvéolo dental e elevação do assoalho de seio maxilar, visando a colocação de implantes e pinos metálicos (Carvalho et al., 1996; Calixto et al., 2001). Em endodontia, o detergente derivado do óleo de *R. communis* apresentou ação antimicrobiana similar ao Hipoclorito de sódio a 0,5% quando usado em canais radiculares com necrose (Ferreira et al., 1999 e 2002). É biocompatível ao tecido periapical (Carvalho et al., 1996) e tem capacidade para remover “smear layer” dos canais radiculares semelhante ao EDTA 17% (Teixeira et al., 2001) e ao Hipoclorito de sódio a 1% (Meneghin et al., 2006). Em prótese dentária, Andrade et al. (2014) concluíram que a solução de *R. communis* a 2% foi comparável ao peróxido alcalino em termos de eficiência na remoção do biofilme de próteses totais. Pinelli et al. (2013) concluíram que o *R. communis* melhorou as condições clínicas de estomatite relacionada à prótese de pacientes institucionalizados de maneira semelhante ao

Miconazol. Badaró et al. (2016b) demonstraram ação intermediária do *R. communis* para remoção de biofilmes de próteses totais e atividade antimicrobiana. Arruda et al. (2016) e Badaró et al. (2016b) comprovaram que a implementação de um protocolo de higienização, associando escovação dos aparelhos protéticos com imersão em *R. communis* foi suficiente para promover remissão da estomatite relacionada à prótese. Segundo et al. (2014), por sua vez, demonstraram que a imersão das próteses na solução de *R. communis* foi efetiva na redução da contagem de micro-organismos, inclusive nas espécies de *Candida*. Salles et al. (2015a) encontraram resultados quanto ação antimicrobiana para *Candida* spp. similares entre o *R. communis* e o Hipoclorito de sódio em menor concentração.

Revisando a literatura, na busca de agentes antimicrobianos e direcionando os achados para o controle de micro-organismos na prevenção de doenças, pode-se encontrar pesquisas empregando a Cloramina T como princípio ativo de solução desinfetante para ambientes hospitalares (Tadeusiak, 1998; Arnitz et al., 2009), de antissépticos bucais (Pitten; Kramer, 1999) e de formulação de dentifrícios específicos para próteses totais (Panzeri et al., 2009; Pisani et al., 2010a; Tirapelli et al., 2010; de Andrade et al., 2012; Leite et al., 2014; Leite, 2015). A Cloramina T possui ação biocida com efetividade tanto em ambiente aeróbio como anaeróbio, mesmo em baixas concentrações (Akzo Nobel Boletim Tecnical, 1995). Bueno (2016), por meio do teste de concentração inibitória mínima pelo método de microdiluições verificou que a concentração de 0,5% de Cloramina T é suficiente para eliminar *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Panzeri et al. (2009) e De Andrade et al. (2012) verificaram que dentifrícios contendo Cloramina T apresentaram eficácia na remoção de biofilme presente em próteses totais. Leite (2015) demonstrou que um dentifrício com Cloramina T apresentou resultado favorável quanto à remoção do biofilme e ação antimicrobiana.

Uma limitação destes estudos é a restrição em avaliar as propriedades de remoção do biofilme e ação antimicrobiana, não apresentando informações quanto aos possíveis efeitos sobre os micro-organismos, ou seja, desenvolvimento de resistência e alterações nos fatores de virulência.

Portanto, mediante a real necessidade do estabelecimento de protocolos eficazes contra o biofilme de próteses removíveis, que sejam seguros para a saúde do paciente e para os materiais constituintes das próteses, estudos clínicos e laboratoriais com período experimental, período de imersão e concentração padronizados devem ser realizados

com o objetivo de propor novas soluções a base de Cloramina T e *R. communis* para higiene de próteses totais, bem como para indicar o uso de uma solução já conhecida como o Hipoclorito de sódio em menor concentração. Ainda, os estudos com Cloramina T empregaram soluções comerciais que apresentam custo elevado para o uso diário, dificultando a adesão dos pacientes a um protocolo de higiene adequado. Com base na Lei nº. 10.973, de 2 de Dezembro de 2004, a qual dispõe sobre incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo, este projeto avaliará a eficácia das formulações propostas e se os resultados obtidos forem favoráveis, será possível a facilitação de acesso e redução de custos para os pacientes. Promover o desenvolvimento de produtos nacionais, não somente tem o objetivo de proporcionar produtos mais adequados ao uso odontológico, mas também gerar propostas e estímulo à indústria nacional, no que se refere ao desenvolvimento e inovação de produtos.

2. Proposição

Objetivo geral:

O objetivo deste estudo foi avaliar, in vivo e in vitro, o efeito de soluções desinfetantes para higiene de próteses totais à base de Hipoclorito de sódio a 0,25%, *Ricinus communis* a 10% e Cloramina T a 0,5% sobre as espécies de *Candida* identificadas em isolados do palato e prótese de indivíduos desdentados totais com estomatite relacionada à prótese.

Objetivos específicos:

- **Estudo in vivo:**
 - Identificar as espécies de *Candida* isoladas do palato e prótese de indivíduos desdentados totais com estomatite relacionada à prótese;
 - Avaliar o efeito das soluções sobre a incidência de *Candida* spp. no palato e prótese de indivíduos desdentados totais com estomatite relacionada à prótese;
 - Avaliar o efeito das soluções desinfetantes sobre o crescimento microbiano das espécies de *Candida*.
- **Estudo in vitro:**
 - Avaliar o efeito das soluções desinfetantes:
 - sobre a capacidade de crescimento de colônias de espécies de *Candida*;
 - sobre o metabolismo celular das espécies de *Candida*;
 - sobre a produção de enzimas hidrolíticas;
 - sobre a formação de hifas;
 - sobre a quantidade de células vivas;
 - quanto a capacidade de remoção do biofilme de espécies de *Candida*.

3. Material e Métodos

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.

Este estudo foi realizado em duas etapas, ou seja, in vivo e in vitro. Para o estudo in vivo, amostras de biofilme de próteses e palatos foram coletadas antes (*Baseline*), após 07 e 37 dias de utilização de soluções desinfetantes (Hipoclorito de sódio a 0,25%, *R. communis* a 10% e Cloramina T a 0,5%) e de salina (controle) pelos participantes. A pesquisa foi desenvolvida com base em um modelo de ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado e grupos paralelos nomeados de acordo com cada solução desinfetante. A amostra foi composta por voluntários desdentados totais usuários de prótese total convencional, diagnosticados com estomatite relacionada à prótese (ERP).

As variáveis de resposta analisadas foram identificação das espécies de *Candida*, incidência de *Candida* spp. em função do uso das soluções e crescimento microbiano em cultura antes e após o uso das soluções desinfetantes. A figura 1 apresenta o fluxograma do estudo in vivo.

Considerando-se uma diferença mínima significativa de 1 ponto e um desvio padrão de 2,2 (Badaró, 2013; Salles, 2013) foi necessária uma amostra de 60 participantes (15 para cada grupo) (*power* 80%; $\alpha=0,05$; $\beta=0,20$) para que houvesse significância estatística.

Para o estudo in vitro, foram utilizadas cepas ATCC das espécies de *Candida* mais incidentes no estudo in vivo. As variáveis de resposta foram mensuradas após a imersão de corpos de prova em resina acrílica termicamente polimerizável com biofilme formado pelas espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), sendo elas: crescimento de colônias, atividade metabólica, produção de enzimas hidrolíticas, formação de hifas, remoção do biofilme e manutenção de células vivas. As análises foram realizadas em triplicata e em três ocasiões.

Os procedimentos clínicos e laboratoriais foram realizados por um mesmo operador dentro da equipe de trabalho atuante, buscando um maior controle das possíveis variações inerentes à troca de pesquisador.

Figura 1 - Fluxograma do estudo in vivo.

3.2. ESTUDO IN VIVO

3.2.1. *Seleção da Amostra*

O desenvolvimento desta pesquisa teve início após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CAAE – 34811414.0.0000.5419) (Anexo A e B). O recrutamento só foi possível após efetiva compreensão da natureza do protocolo de pesquisa, explicado de forma individualizada para cada participante, que, ao aceitar compor a amostragem do estudo, assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

Os participantes foram recrutados na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP – USP) no período de janeiro de 2015 a janeiro de 2016, junto à disciplina clínica de Prótese Total (amostra de conveniência). A condição de saúde dos participantes foi verificada por meio de anamnese. A ERP foi diagnosticada após exame clínico da cavidade bucal, utilizando espátula de madeira e luz do refletor, baseando-se na Classificação de Newton modificada (Kabawat et al., 2014), sendo:

- 0 (zero): Mucosa saudável;
- Tipo IA: Petéquias no tecido palatal normal, geralmente encontradas ao redor dos orifícios dos dutos das glândulas da mucosa do palato;
- Tipo IB: Áreas localizadas de inflamação da área recoberta pela prótese total;
- Tipo II: Área generalizada de inflamação envolvendo a área recoberta pela prótese total;
- Tipo III: Superfície hiperplásica do palato com inflamação da área recoberta pela prótese.

3.2.2. *Crítérios de Inclusão*

Todos os participantes deveriam apresentar ERP (tipo IB a tipo III) e fazer uso regular de próteses totais convencionais com base e dentes artificiais em resina acrílica por no mínimo um ano. As próteses totais deveriam estar em condições adequadas de uso quanto à adaptação, retenção, suporte e estabilidade, contendo biofilme na superfície interna superior (escore igual ou maior que 1, segundo o Índice Aditivo de Ambjørnsen et al., 1984, Quadro 1).

Quadro 1 – Descrição da aplicação do Índice Aditivo de Ambjørnsen et al. (1984).

A. Remover as próteses totais da cavidade bucal dos participantes e enxaguá-las em água corrente por 5 segundos para remoção do excesso de saliva e secá-las com um jato de ar por 10 segundos;
B. Dividir a superfície interna em cinco áreas: 1. Papila incisiva; 2 e 3. Duas áreas localizadas lateralmente a 1 cm da linha mediana; 4 e 5. Duas áreas posteriores (tuberosidades):
C. Limitar cada área, visualmente, com um círculo de 1 cm de diâmetro e realizar o exame sob iluminação do refletor de luz do equipamento odontológico;
D. Atribuir escores para cada área de acordo com o seguinte critério: escore 0 - sem biofilme; escore 1 - biofilme visível ao raspar a superfície com instrumento rombo; escore 2 - acúmulo de biofilme moderado, visível na presença de luz; escore 3 - acúmulo abundante de biofilme.
E. Selecionar as próteses com escore igual ou maior que 1 para cada área.

3.2.3. Critérios de Exclusão

Como critérios de exclusão foram considerados próteses com problemas na adaptação, reembasamento, reparos e/ou fraturas. Fatores relacionados ao indivíduo também foram pesquisados, como doenças infecciosas sistêmicas ou locais, além das bucais, presença ou tratamento de neoplasias, tabagismo e uso de drogas imunossupressoras, antibiótico e/ou antifúngico sistêmico nos três meses anteriores ao estudo. Hábitos regulares de higienização também foram considerados, sendo excluídos pacientes que utilizavam soluções de imersão e/ou escovação do palato regularmente.

Um questionário, visando traçar o perfil da amostra final, assim como avaliar as condições de saúde, medicamentos frequentemente administrados e aspectos socioeconômicos dos participantes foi preenchido (Apêndice B).

Os participantes foram orientados a manter a higienização habitual das próteses até receberem as instruções e materiais de limpeza preconizados pela pesquisa.

3.2.4. Formação dos Grupos e Intervenções - Protocolo de Higiene

Os participantes foram randomizados considerando uma sequência numérica aleatória gerada por computador (Microsoft Excel 2010; Microsoft Corporation, Redmond, EUA). Em função das soluções desinfetantes, quatro grupos paralelos foram formados:

1. Grupo controle (C): solução de Cloreto de sódio a 0,85% - solução salina (n=15);
2. Grupo Hipoclorito de sódio (HS 0,25%): solução de Hipoclorito de sódio a 0,25% (Farmácia de Manipulação Inject Center, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (n=15);
3. Grupo *Ricinus communis* (RC 10%): solução de *Ricinus communis* a 10% (Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil) (n=15);
4. Grupo Cloramina T (CT 0,5%): solução de Cloramina T a 0,5% (Lio Serum Produtos Laboratoriais e Hospitalares Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). (n=15).

Independente das soluções utilizadas, todos os participantes receberam as mesmas orientações de higiene verbalmente e por escrito (Apêndice C), sendo elas:

- Escovação das próteses com escova específica para próteses totais (Escova de Prótese BDC 152/153 - Curaprox - Curaden Swiss do Brasil Imp. Exp. Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) e sabonete líquido neutro por 3 minutos (Pleasant, Perol Comercial e Industrial Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) após as refeições (café da manhã, almoço e jantar) (Figura 2A);
- Imersão das próteses totais superiores em 200 mL da solução recebida, por 20 minutos, antes da última escovação do dia. Após o tempo de imersão, escovar as próteses;
- Escovação do palato duro com uma escova dental tradicional de cerdas macias (Escova dental adulto CS 5460 - Curaprox - Curaden Swiss do Brasil Imp. Exp. Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil), após cada refeição (café da manhã, almoço e jantar), durante 2 minutos (Figura 2B);

Figura 2 - (A) Escova convencional com cerdas macias para o palato; (B) Escova específica para prótese total.

A linguagem utilizada durante as orientações aos participantes foi simplificada para melhor compreensão do protocolo de higiene.

De forma complementar, aos participantes foi solicitado dormir sem as próteses, colocando-as em um recipiente com água durante todo o período noturno e, ao amanhecer, antes de inseri-las na cavidade bucal, enxaguá-las abundantemente em água corrente.

3.2.5. *Controle dos Vieses*

Como forma de garantir o “cegamento” do pesquisador e dos participantes, as soluções desinfetantes foram condicionadas em frascos idênticos, de cor âmbar e identificadas com números (Figura 3A) por um pesquisador distinto, não envolvido na distribuição das soluções e análise dos resultados. O sabonete líquido neutro foi depositado em frasco com dosador (Figura 3B). Todos os produtos foram dosados com quantidade suficiente para o uso contínuo durante 7 dias (1400 mL) para maior controle e acompanhamento do protocolo de higiene.

Figura 3 - (A) Soluções desinfetantes; (B) Sabonete líquido neutro condicionado em frasco dosador.

Um pesquisador (P1), não envolvido com as demais etapas da pesquisa gerou a lista para aleatorização da amostra (Microsoft Excel 2010). Um segundo pesquisador (P2) distribuiu os produtos de higiene, orientou os participantes para o uso, recolheu e enviou as próteses ao laboratório para evidencição da superfície interna, coleta do biofilme para semeadura e higienização das mesmas pelo pesquisador 3 (P3). Enquanto as próteses permaneceram no laboratório, o pesquisador P2 efetuou a coleta do biofilme do palato dos voluntários.

O pesquisador P2 foi responsável por realizar a semeadura do biofilme coletado da prótese e palato dos voluntários, a contagem e o cálculo de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e a tabulação dos dados obtidos (Microsoft Excel 2010) para a realização da análise estatística (pesquisador P4).

3.2.6. Coleta do Biofilme da Prótese Total

Para coleta do biofilme da prótese, os seguintes procedimentos foram realizados:

- Os aparelhos protéticos foram removidos da cavidade bucal dos voluntários, enxaguados em água corrente por 5 segundos e secos com jato de ar por 10 segundos (Figura 4A);
- A superfície interna das próteses totais superiores foi evidenciada com vermelho neutro a 1% com auxílio de cotonete (Figuras 4B e 4C), seguido de enxague por 5 segundos para remoção do excesso de evidenciador e secagem com jato de ar por 10 segundos (Figura 4D);

Figura 4 – (A) Aspecto inicial da prótese sem qualquer intervenção; (B) Evidenciação da prótese total com vermelho neutro a 1%; (C) Uniformização da solução de vermelho neutro a 1% sobre a superfície interna da prótese total; (D) Prótese total com o biofilme evidenciado (Badaró, 2013).

- Os aparelhos protéticos corados eram posicionados em placas de Petri, em zona asséptica, para dissolução do biofilme com escova esterilizada (Tek, cerdas macias, Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda., S. J. dos Campos, SP, Brasil) associada com 10 mL de PBS (tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*) (Panzeri et al., 2009). A apreensão das próteses durante a escovação (3 minutos) foi efetuada por pinças estéreis e individuais (Figura 5). A suspensão obtida (biofilme + PBS) foi transferida, com auxílio de pipeta, para um tubo de ensaio contendo pérolas de vidro (Silva-Lovato et al., 2010; Paranhos et al., 2013). Este procedimento foi realizado pelo Pesquisador 3 (P3). As coletas foram armazenadas sob refrigeração (0 a 5°C) até o início da semeadura;

Figura 5 - Coleta do biofilme presente na superfície interna da prótese total superior.

- Após coleta do biofilme, as próteses eram higienizadas pelo método mecânico de escovação (escova Denture - Condor S.A., Santa Catarina, Brasil) e sabão líquido neutro e devolvidas aos participantes (Figuras 6A e 6B). Dessa forma, todas as próteses obtiveram condição padrão de limpeza antes do período experimental.

Figura 6 – (A) Higienização da prótese evidenciada por escovação; (B) Aspecto final da prótese com biofilme eliminado (Badaró, 2013).

- Os procedimentos de evidenciação, coleta e eliminação total do biofilme foram realizados em todas as etapas correspondentes aos períodos de coleta, ou seja, *Baseline* (antes do uso das soluções desinfetantes), após 7 e 37 dias de utilização dos produtos.

3.2.7. Coleta do Biofilme do Palato

A coleta do biofilme do palato dos voluntários foi realizada concomitantemente às realizadas para as próteses totais (*Baseline*, após 7 e 37 dias de realização do protocolo de higiene). Para tanto, o Pesquisador 2 (P2) seguiu os procedimentos preconizados por Kabawat et al. (2014). O biofilme foi coletado das regiões palatinas acometidas pela estomatite relacionada à prótese com o auxílio de uma escova de citologia estéril e individual, tão logo o aparelho protético tivesse sido removido da cavidade bucal. Movimentos de fricção em toda a fibromucosa do palato foram realizados durante 1 minuto (Figura 7). Em seguida, a ponta ativa da escova de citologia foi seccionada e armazenada em tubo estéril contendo 5 mL de solução PBS. A amostra foi mantida sob refrigeração (0 a 5°C) até a semeadura das amostras em meio de cultura.

Figura 7 - Coleta do biofilme do palato.

3.2.8. Semeadura das Amostras

Finalizadas as coletas, as amostras foram agitadas por 1 minuto em agitador Vórtex (Phoenix® – AP56, Ind. E Com. de Equip. Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil). Em seguida, 50 µL foram diluídos em 450 µL de solução de PBS de forma sequencial, obtendo-se diluições seriadas de 10^0 a 10^{-3} , as quais foram semeadas em placas de Petri com meio de cultura CHROMagar (Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan, EUA) e incubadas a 37°C por 48 horas em estufa microbiológica (De Leo Equipamentos Laboratoriais, Porto Alegre, RS, Brasil) (Apêndices D, E, F e G). As figuras 8 e 9 exemplificam o crescimento de colônias das espécies de *Candida* coletadas na prótese e no palato, nas diferentes diluições.

Figura 8 - Placas de Petri com meio de cultura CHROMagar e crescimento das espécies de *Candida* nas diferentes diluições das amostras coletadas das próteses. (A) 10^0 ; (B) 10^{-1} ; (C) 10^{-2} .

Figura 9 - Placas de Petri com meio de cultura CHROMagar e crescimento das espécies de *Candida* nas diferentes diluições das amostras coletadas do palato. (A) 10^0 ; (B) 10^{-1} ; (C) 10^{-2} .

3.2.9. Identificação de *Candida* spp. e Avaliação do Crescimento Microbiano

Após 48 horas de incubação, o pesquisador P2 realizou a identificação das espécies de *Candida* pela diferenciação das cores obtidas em meio de cultura CHROMagar. As características morfofotintoriais das colônias de *Candida* foram classificadas de acordo com a preconização do fabricante do meio de cultura CHROMagar (Tabela 1). Em seguida, foi realizada a contagem de UFC para comparação do crescimento microbiano antes e após a utilização das soluções.

Tabela 1. Características morfofotintoriais atribuídas às *Candida* spp. semeadas em meio de cultura CHROMagar.

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

Para o cálculo de UFC/mL de cada espécie considerou-se a diluição em que o número de UFC variou entre 0 e 300 colônias, empregando a fórmula:

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

Sendo, n: valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3); q: quantidade (mL) pipetada para cada diluição quando da semeadura (0,05 mL).

3.3. ESTUDO IN VITRO

Para mensuração das variáveis laboratoriais, as espécies de *Candida* da Tabela 2 foram utilizadas para formação de biofilme sobre a superfície de espécimes em resina acrílica termopolimerizável (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) com o objetivo de simular a superfície da prótese total removível. Todo o experimento foi realizado em triplicata em três ocasiões.

Tabela 2 - Espécies de *Candida* ATCC utilizadas.

Microrganismos	Identificação	Característica
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Leveduras
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 750	Leveduras
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001	Leveduras

ATCC, American Type Culture Collection.

3.3.1. *Confecção dos Espécimes*

Espécimes em formato discoide, com dimensões padronizadas (13x3mm) foram confeccionados em resina acrílica termopolimerizável. Dez matrizes metálicas foram incluídas em mufla convencional (OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) com gesso pedra tipo III (Gesso Rio, Orlando Antônio Bussioli ME, Rio Claro, SP, Brasil) e silicone de condensação denso (Zetalabor, Zhermack S.p. A, Badia Polesine, Rovigo, Italy) para obtenção dos moldes para posterior acondicionamento da resina acrílica (Figuras 10A e 10B).

Figura 10 – (A) Matrizes metálicas para confecção dos moldes em silicone; (B) Mufla com os moldes incluídos.

A resina acrílica foi manipulada de acordo com as recomendações do fabricante, acomodada nos moldes da mufla e prensada (Prensa Hidráulica– Protecni, Protecni Equip. Med., Araraquara, SP, Brasil) a 1250 Kgf/ 30 minutos. O método convencional em banho de água foi utilizado para polimerização em polimerizadora automática (Termocicler 100, Oficina de Precisão, Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil), ou seja, a mufla foi colocada em água com temperatura ambiente, a qual atingiu 65°C em 1 hora. Em seguida a temperatura foi elevada a 100°C em meia hora e mantida por 01 hora. O resfriamento foi realizado em temperatura ambiente.

Após a desinclusão, os espécimes receberam acabamento com peça reta (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil) e fresas multilaminadas (Maxicut, Malleifer AS, Ballaiguer, Suíça). Em seguida, utilizou-se politriz (Arotec, Aropol E, Cotia, SP, Brasil) com lixa d'água de granulação 180 (Norton, Norton Saint-Gobain, Guarulhos, Brasil) para padronização da rugosidade superficial dos espécimes, em ambos os lados (Figuras 11A e 11B).

Figura 11 - (A) Acabamento dos espécimes com peça reta e fresa; (B) Padronização da rugosidade de superfície em politriz com lixa.

A mensuração da rugosidade de superfície (Ra) foi realizada em rugosímetro (Surftest SJ-201P, Mitutoyo Corporation, Japan) com três leituras de 5 “cutofs” de 0,8 μm (Figura 12). As leituras foram realizadas sobre a porção central e a 2 mm de distância para direita e esquerda, obtendo três valores para cálculo da média final. Os espécimes foram padronizados com Ra variando de 2,7 a 3,7 μm (Panariello et al., 2016) (Apêndice H).

Figura 12 – Espécime posicionado no rugosímetro para leitura da rugosidade de superfície.

3.3.2. *Formação dos Grupos*

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- C – Controle (n=24/cepa): imersão em água destilada estéril;
- HS 0,25% (n=24/ cepa): imersão em Hipoclorito de sódio a 0,25%;
- RC 10% (n=24/ cepa): imersão em *R. communis* a 10%;
- CT 0,5% (n=24/ cepa): imersão em solução de Cloramina T a 0,5%;

No total, 288 espécimes foram confeccionados e distribuídos nos grupos citados, com a seguinte finalidade:

- 9 espécimes para quantificação de UFC;
- 9 espécimes para atividade metabólica (XTT);
- 3 espécimes para análise em microscopia de fluorescência;
- 3 espécimes para confirmação da esterilidade do procedimento.

O grupo controle teve como objetivo confirmar a contaminação dos espécimes por *Candida* spp. e traçar um parâmetro de comparação para a ação das soluções desinfetantes. Este grupo deveria apresentar crescimento de *Candida* spp., para comprovação da efetividade da contaminação (confirmação microbiológica da contaminação).

Para garantir a qualidade dos testes microbiológicos, um grupo denominado controle negativo foi formado para confirmar a esterilidade dos espécimes e do meio de cultura. Assim, três corpos de prova estéreis, para cada grupo/cepa, não foram contaminados pelos inóculos e foram colocados em meio de cultura estéril e incubados em estufa bacteriológica, nas mesmas condições que os demais grupos. O não crescimento de *Candida* spp. ou qualquer outro microrganismo, confirmou o procedimento de esterilização.

3.3.3. Esterilização dos Espécimes

Os espécimes, distribuídos aleatoriamente em pequenos grupos, foram imersos em béquer com água destilada (200 mL) e submetidos à esterilização por irradiação em forno de micro-ondas (Panasonic, modelo Perfect, 127V; 800W; 2450MHz) a 650W, durante 6 minutos de exposição (Silva et al., 2006).

3.3.4. Formação do Biofilme de *Candida* spp.

Como meios de cultura foram utilizados:

- Sabourand Dextrose Broth – SDB (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia): para preparação do inóculo microbiano e contaminação dos espécimes com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.
- Sabourand Dextrose Agar – SDA (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia): para semeadura da suspensão obtida após a imersão dos espécimes contaminados com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* nas soluções.
- Letheen Broth – LB (Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan, EUA): utilizado para submersão dos espécimes previamente à mensuração da produção de enzimas hidrolíticas e formação de hifas, bem como confirmação da esterilidade.

Para a formação de biofilme, as cepas de *Candida* foram descongeladas e reativadas em ágar Sabouraud Dextrose, com armazenamento em estufa bacteriológica a 37° C, durante 48 horas. Em seguida, uma alçada foi transferida para o caldo Sabouraud Dextrose e incubada a 37° C por 18 horas. Para padronização dos inóculos, as espécies de *Candida* foram centrifugadas a 4000 rpm (centrífuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 5 minutos, lavadas e ressuspensas em PBS. A contagem da suspensão microbiana foi obtida em câmara de Neubauer (HBG, Alemanha). Em seguida, o meio de cultura foi inoculado a uma concentração de 1×10^6 células/ mL.

Assepticamente, em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, São Paulo, Brasil) os espécimes foram distribuídos em placas de cultura celular de 24 poços (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça). Cada poço recebeu 1,5 mL de meio de cultura inoculado, com exceção do grupo controle negativo, para o qual foi utilizado meio de cultura estéril. As placas foram incubadas a 37°C por 1h e 30 minutos sob agitação de 75 rpm em estufa microbiológica (Incubadora Shaker, Mod. CE-320, CienLab, Campinas, SP, Brasil) para aderência dos microrganismos aos espécimes. Em seguida, cada espécime e poço foram lavados com solução PBS para remoção dos microrganismos não aderidos e 1,5 mL de meio de cultura estéril foram novamente inseridos em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C sob agitação de 75 rpm e após 24 horas, houve a troca de metade do conteúdo por meio de cultura novo, para evitar a saturação. Decorridas 48 horas totais de crescimento do biofilme (Figura 13) (Marra et al., 2012), os espécimes foram imersos nas soluções desinfetantes.

Figura 13 – Corpos de prova em placa de cultura de 24 poços com biofilme formado após 48 horas.

3.3.5. Desinfecção dos Espécimes

Com uma pinça esterilizada, cada espécime foi transferido individualmente da placa de cultura para tubos de polietileno com tampa rosqueável (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) contendo 5 mL de uma das soluções estudadas – Hipoclorito de sódio 0,25%, *R. communis* 10%, Cloramina T a 0,5% ou água destilada estéril. Os tubos permaneceram em repouso sobre a bancada por 20 minutos. Em seguida, os espécimes foram removidos da solução e enxaguados 3 vezes em PBS para remoção dos resíduos das soluções desinfetantes, e colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio Letheen. O mesmo foi feito para os espécimes não contaminados pertencentes ao grupo controle negativo. O conjunto tubo de ensaio/espécime foi levado a uma cuba de ultrassom (Altsonic, Clean 9CA,

Ribeirão Preto, SP, Brasil), onde permaneceu durante 20 minutos a 200 Watts, para o desprendimento dos microrganismos não eliminados pelo procedimento de desinfecção.

3.3.6. Avaliação do Crescimento Microbiano

Os tubos de ensaio foram removidos da cuba de ultrassom e agitados por 1 minuto com o auxílio de um agitador Vórtex (Phoenix® – AP56, Ind. E Com. de Equip. Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil). Em seguida, 50 µL foram diluídos em 450 µL de solução de PBS sequencialmente obtendo-se diluições seriadas de 10^0 a 10^{-3} , as quais foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sabourand Dextrose e incubadas a 37°C em estufa microbiológica por 48 horas (Apêndice I). A figura 14 exemplifica o crescimento microbiano após incubação.

Figura 14 - Placa de Petri com diferentes diluições (10^0 a 10^{-3}) semeadas de cultura de *Candida albicans*.

Para o cálculo das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), considerou-se a diluição em que o número de colônias variou entre 0 e 300 e a seguinte fórmula foi utilizada:

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

sendo, n: valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3); q: quantidade (mL) pipetada para cada diluição quando da semeadura (0,025 mL).

Os tubos de ensaio contendo os espécimes imersos em meio Lethen foram incubados a 37°C por 24 horas. A seguir alíquotas foram destinadas aos ensaios de produção de enzimas hidrolíticas e formação de hifas. A suspensão remanescente permaneceu incubada a 37°C por

até 28 dias em estufa microbiológica (confirmação da esterilidade). A turvação foi avaliada diariamente e comparada à presença ou ausência do crescimento de microrganismos nas placas semeadas (Figura 15A e 15B).

Figura 15 - Comparação da turvação do meio de cultura dos tubos de ensaio/espécime com as placas de Petri correspondentes. (A) Ausência de turvação e crescimento microbiano; (B) Presença de turvação e crescimento microbiano.

3.3.7. Avaliação do Metabolismo Celular

Os espécimes (n=9) com biofilme foram submetidos ao ensaio de XTT [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida] para avaliação da atividade metabólica dos microrganismos não eliminados pelo procedimento de imersão nas soluções. O teste baseou-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de microrganismos metabolicamente ativos converterem o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em um produto solúvel em água - formazana (cor laranja), o que foi mensurado em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia) (Figura 16A). Dessa forma, a redução bioquímica do XTT pode ser empregada para medir a atividade metabólica de biofilmes.

O XTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) foi dissolvido em tampão PBS a uma concentração final de 1 mg/mL. A solução de menadiona (Sigma-Aldrich, Saint Louis,

Missouri, EUA) foi preparada à concentração de 0,4 mM em acetona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) imediatamente antes do uso. Para cada ensaio, a solução de XTT foi misturada com a solução de menadiona a uma razão de volume de 20:1.

Os espécimes com biofilme foram imersos nas soluções desinfetantes por 20 minutos, lavados três vezes com PBS para remoção de resíduos e transferidos para placa de cultura de células estéril com 24 poços, cada um contendo 1,2 mL de solução composta de 948 μ L de PBS suplementado com 100 mM de glicose (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), 252 μ L de solução de XTT e menadiona previamente preparada. As placas foram cobertas com folha de alumínio e incubadas no escuro a 37°C durante 2h. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram gentilmente agitadas e 100 μ L da solução de cada poço contendo um corpo de prova foram transferidos para placas de 96 poços, em triplicata (Figura 16B) e três leituras foram obtidas a 492 nm e a média foi registrada.

Figura 16 - (A) Leitor de microplacas; (B) Placa de 96 poços contendo as amostras do XTT.

3.3.8. Avaliação da Produção de Proteinase e Fosfolipase

Após a formação do biofilme, exposição dos espécimes às soluções desinfetantes e transferência para o meio de cultura Letheen, o tubo foi incubado por 24 horas. A concentração celular de cada amostra foi determinada em câmara de Neubauer, para posterior correlação com os resultados obtidos.

Um mililitro da suspensão celular foi transferido para microtubos, o qual foi centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para análise da proteinase e o *pellet* para análise da fosfolipase (Figura 17). O ensaio foi realizado em triplicata em três ocasiões.

Figura 17 - Microtubo após centrifugação demonstrando o sobrenadante destinado à análise de Proteinase e o *pellet* para Fosfolipase.

A quantificação de proteinase foi realizada por meio do kit fluorimétrico EnzChek® Protease Assay (Molecular Probe E6638, Eugene, Oregon, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ L do sobrenadante e 100 μ L da solução caseína BODIPY, previamente preparada a partir de 200 μ L da solução de caseína BODIPY (1,0 mg/mL) e 19,8 mL do tampão de digestão (1:20) (Figura 18). A placa foi incubada em temperatura ambiente e protegida da luz durante 2 horas para leitura de fluorescência em leitor de microplacas (Synergy II, BioTek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos), com excitação de 485 nm e emissão em 538 nm. Os valores alcançados foram utilizados em equações lineares derivadas de curvas padrão, sendo a atividade enzimática expressa em μ L/ mL.

Figura 18 - Placa de cultura preparada para a leitura de fluorescência e análise da produção de Proteinase.

A avaliação da produção de fosfolipase pelas espécies de *Candida* spp. foi realizada por meio do kit fluorimétrico Amplex Red® Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Assay (Molecular Probe, Eugene, Oregon, EUA), considerando as recomendações do fabricante. Para isso, o *pellet* previamente obtido foi ressuspenso em tampão lise (2M Tris-

HCl, 1M CaCl₂, água ultra-pura, pH 7,4), levado ao vórtex durante 20 segundos (disrupção) e centrifugado por 5 minutos, com rotação de 10.000 rpm (lisado de cada condição experimental). A solução de trabalho foi obtida pela adição de 200 µL do reagente Amplex Red (20mM), 100 µL do Horseradish Peroxidase, 200 µL de Alkaline Phosphatase, 100 µL Choline Oxidase e 78 µL de Lecitina em 9,32 mL do tampão de digestão (1:5). Em seguida, 100 µL da solução de trabalho e do lisado foram pipetados nos poços de uma placa de 96 poços para testes de fluorescência, em triplicata. A placa foi mantida a 37°C, em estufa microbiológica por 3 horas protegida da luz (Figura 19).

Figura 19 - Placa de cultura preparada para leitura de fluorescência e análise da produção de Fosfolipase.

A leitura da fluorescência foi executada em leitor de microplacas com excitação em 544 nm e emissão em 590 nm (Figuras 20A e 20B). Os valores obtidos foram comparados com os valores de fluorescência dos controles positivos fornecidos pelo fabricante.

Figura 20 – (A) Leitor de microplacas; (B) Placa específica para testes de fluorescência em posição no leitor.

3.3.9. Avaliação da Formação de Hifas

Os procedimentos iniciais para a avaliação da formação de hifas foram idênticos aos realizados para análise da produção de enzimas hidrolíticas: formação do biofilme de *Candida* spp., imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e incubação em meio Letheen por 24 horas. Portanto, os ensaios foram realizados concomitantemente, utilizando as mesmas amostras, onde parte foi utilizada para análise da produção de enzimas e parte para análise da formação de hifas.

Após contagem do número de células em câmara de Neubauer, um volume de 3×10^6 células/mL foi transferido para 5 mL de meio indutor de hifas (meio 199; LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). As células foram incubadas a 37°C em estufa sob agitação de 80 rpm, durante 3 horas. A contagem de células (leveduras + hifas) foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio óptico (Bio-Focus Saintifik SDN BHD, Petaling Jaya, Malásia) com objetiva de 10x a 40x (Figura 21).

Figura 21 – (A) Câmara de Neubauer; (B) Imagem em microscópio com aumento de 10x para contagem de células em forma de hifas.

A contagem de células em forma de hifas foi realizada nos quatro maiores quadrantes da câmara de Neubauer e a média foi multiplicada pela diluição e fator de correção inerente ao método para unidade em mL. A fórmula utilizada foi a seguinte:

$$\text{Hifas/mL} = \frac{\underline{S}}{4} \times D \times 10^4$$

Sendo, S: soma dos quatro maiores quadrantes da câmara de Neubauer; D: diluição utilizada para contagem (10x).

3.3.10. Quantificação do Biofilme Total e de Células Vivas

A identificação de células vivas e mortas do biofilme consistiu na impregnação de corantes específicos com propriedades fluorescentes.

Para análise desta variável, os procedimentos de formação do biofilme das espécies de *Candida* foram realizados conforme descrito anteriormente. Em seguida, os espécimes (n=3) com o biofilme formado foram imersos nas soluções desinfetantes por 20 min, enxaguados 4 vezes em PBS e transferidos para uma nova placa de 24 poços contendo 1,2 mL do corante Live/Dead®.

A manipulação do corante consistiu na diluição das soluções do kit Live/Dead® BacLight™ (Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biotec. Ltda, Itapevi, SP, Brasil), ou seja, 2,5 µL do componente A e 2,5 µL do componente B foram diluídos em 15 mL de água destilada estéril. Foram aplicados 1,2 mL sobre a superfície do espécime e este foi incubado, protegido da luz à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, os espécimes foram lavados em PBS para remoção do excesso de corante.

Os espécimes foram cuidadosamente secos com papel absorvente e posicionados em lamínulas individuais para análise em microscópio de fluorescência com filtros apropriados e objetiva de 63x (microscópio invertido Observer. A1 – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Os filtros foram FS38HE para coloração verde e FS43HE para vermelha (Figura 22A e 22B).

Figura 22 - Leitura superficial, em microscópio de epifluorescência, do espécime após imersão em solução desinfetante. (A) filtro FS43HE – vermelha; (B) filtro FS38HE - verde.

A quantificação de microrganismos vivos e mortos foi realizada pela diferença de coloração das células, onde os microrganismos vivos eram corados em verde (Syto 9) e os microrganismos mortos eram corados em vermelho (Iodeto) (Figura 23A e 23B). A diferença de coloração se deve à integridade da membrana celular, onde os microrganismos vivos

apresentam-se com a membrana intacta e os mortos com a membrana danificada permitindo a entrada do corante. A quantificação de biofilme total na superfície foi dada pela somatória entre células vivas e mortas.

Durante as análises em microscópio, foram capturadas aproximadamente 20 imagens aleatórias da superfície de cada espécime em aumento de 63x, por meio do *software* Zen Lite 2.3 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A quantificação de células vivas e mortas foi efetuada empregando o *software* AxioVision (AxioVision release 4.8.2. – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), o qual permitiu quantificar a área total das imagens e as áreas coradas em verde e vermelho.

Figura 23 - Área dos espécimes coberta por biofilme após imersão em solução desinfetante. (A) Coloração verde indica células vivas; (B) Coloração vermelha indica células mortas.

Os valores obtidos foram submetidos às seguintes fórmulas para o cálculo da área recoberta com células vivas e biofilme total, em porcentagem:

$$\text{Porcentagem de células vivas} = \frac{\text{Área com células vivas}}{\text{Área total da imagem}} \times 100$$

$$\text{Porcentagem total de biofilme} = \frac{\text{Área com biofilme}}{\text{Área total da imagem}} \times 100$$

3.4. ANÁLISE DOS DADOS

Para análise dos dados, foram consideradas as seguintes variáveis:

- Estudo in vivo
 - Identificação de *Candida* spp.;
 - Incidência de *Candida* spp.;
 - Crescimento das espécies de *Candida*.
- Estudo in vitro
 - Crescimento de *Candida* spp.;
 - Metabolismo celular;
 - Produção de enzimas hidrolíticas;
 - Formação de hifas;
 - Presença de células vivas no biofilme;
 - Quantificação do biofilme total.

Como fatores de variação, foram considerados:

- Estudo in vivo

Para os dois sítios de coleta, palato e superfície interna da prótese total foram considerados:

- Soluções: Salina (Cloreto de sódio a 0,85%), Hipoclorito de sódio a 0,25%, *Ricinus communis* a 10% e Cloramina T a 0,5%;
- Período de tempo: *Baseline*, 07 e 37 dias de utilização das soluções.

- Estudo in vitro

- Soluções: Água destilada estéril (controle), Hipoclorito de sódio a 0,25%, *Ricinus communis* a 10% e Cloramina T a 0,5%;

Uma vez obtidos os dados, os mesmos foram submetidos à análise de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Teste de Levene), para definição do método estatístico mais apropriado (paramétrico ou não paramétrico).

Para o estudo in vivo, análises descritivas foram utilizadas para interpretação dos dados referentes às características sociodemográficas da amostra, identificação e incidência

das *Candida* spp. após uso das soluções desinfetantes. Os testes Kruskal-Wallis e Friedman, com pós-teste stepwise step-down foram utilizados para as análises dos resultados de crescimento celular (UFC).

Para o estudo in vitro, os resultados foram analisados da seguinte forma:

- Capacidade de crescimento celular (UFC): Teste Anova (One-way) e pós teste de Tukey;
- Metabolismo celular: Teste Anova (one-way) e pós-teste de Tukey (*C. albicans* e *C. tropicalis*); teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de stepwise step-down (*C. glabrata*);
- Produção de enzimas hidrolíticas e formação de hifas: Teste de Kruskal-Wallis;
- Capacidade de remoção de biofilme e manutenção de células vivas: Teste de Kruskal-Wallis; Comparação entre quantidade de biofilme vivo e biofilme total: Teste de Wilcoxon.

As análises foram conduzidas com auxílio do software estatístico SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Todos os testes foram realizados usando um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

Análises descritivas para as imagens da quantificação do biofilme total e de células vivas foram efetuadas.

4. Resultados

4.1. ESTUDO IN VIVO

4.1.1 Dados sociodemográficos

Para a seleção da amostra foram avaliados 108 indivíduos dos quais 46 não atendiam aos fatores de inclusão do estudo, uma vez que trinta e sete possuíam comprometimento do estado de saúde decorrente do Diabetes tipo I ou II (estando ou não controlado, mesmo com acompanhamento médico), 5 não aceitaram participar, 3 estavam em tratamento com fármacos (antifúngicos ou antibióticos) e 1 havia recebido próteses novas.

Ao final, 62 indivíduos atenderam aos critérios necessários e compuseram a amostra do estudo, atendendo o cálculo do tamanho amostral. Posteriormente à compreensão do protocolo proposto e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os indivíduos selecionados foram aleatorizados em quatro grupos paralelos. Ao longo do período experimental, de 37 dias, houve perda de dois pacientes decorrente da realização incorreta dos procedimentos de higiene.

A seguir, a figura 24 apresenta a evolução da amostra durante todas as etapas do estudo.

Figura 24 - Fluxograma (Schulz et al., 2010).

A amostra foi composta por 60 participantes, dos quais 53 eram do gênero feminino (88%) e 7 do gênero masculino (12%) com idade média de 65 anos sendo 58% deles aposentados. 65% dos participantes eram naturais do estado de São Paulo, 23% dos demais estados pertencentes à região Sudeste (MG, ES e RJ) e 11% da amostra era natural de outras

regiões do país, com exceção da região Norte. Com relação ao grau de escolaridade, 76,7% dos indivíduos estudaram até o 1º grau e 11,7% até o 2º grau; 11,7% não apresentavam formação escolar (analfabetos).

Quanto ao estado civil, verificou-se que 56,67% eram casados, 21,67% viúvos, 15% divorciados e 6,67% solteiros; 83% dos participantes residiam com a família.

A tabela 3 demonstra as características qualitativas e quantitativas da amostra final de acordo com cada grupo pesquisado.

Tabela 3 - Dados sociodemográficos das amostras selecionadas considerando os grupos de alocação.

Variável	Salina	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%
Gênero				
Masculino	3	0	3	1
Feminino	12	15	12	14
Idade	64,73	62,6	68,2	65
Local de nascimento				
SP	12	8	10	9
Região Sudeste (RJ, ES e MG)	1	4	5	4
Região Sul	0	1	0	1
Região Norte	0	0	0	0
Região Nordeste	1	1	0	1
Região Centro-Oeste	1	1	0	0
Reside com				
Família	13	13	12	12
Sozinho	2	2	3	3
Instrução				
Analfabeto	1	3	2	1
1º grau	11	12	11	12
2º grau	3	0	2	2
Superior	0	0	0	0
Estado Civil				
Casado	11	7	7	9
Solteiro	0	2	1	1
Viúvo	3	4	3	3
Divorciado	1	2	4	2
Profissão				
Aposentado	9	6	9	12
Desempregado	3	6	1	1
Empregado/ Autônomo	3	3	5	2

4.1.2. Identificação das espécies de *Candida* isoladas do palato e prótese de indivíduos desdentados totais com Estomatite relacionada à prótese

Ao longo do estudo, houve a incidência de *Candida* spp. 301 vezes, das quais, 66% foram oriundos das próteses totais e 34% do palato. Para os dois sítios, a incidência maior foi de *C. albicans* (54,5%), seguida de *C. tropicalis* (22%), *C. glabrata* (16%) e *C. krusei* (1,5%)

(Tabela 4), enquanto que 6% do total cresceram com cor branca, sendo então classificados como outras espécies, de acordo com o recomendado pelo fabricante do meio de cultura CHROMagar (meio cromogênico).

Tabela 4 - Incidência das diferentes espécies de *Candida* identificadas nas próteses e palato ao longo do período experimental.

<i>Candida</i> spp.	Prótese	Palato	Total (%)
			Prótese e Palato
<i>C. albicans</i>	118	46	164 (54,5%)
<i>C. tropicalis</i>	39	27	66 (22%)
<i>C. glabrata</i>	31	17	48 (16%)
<i>C. krusei</i>	2	3	5 (1,5%)
Outras	8	10	18 (6%)
Total	198 (66%)	103 (34%)	301 (100%)

4.1.3. Efeito das soluções sobre a incidência de *Candida* spp. no palato e prótese de indivíduos desdentados totais com estomatite relacionada à prótese.

Considerando individualmente cada grupo de solução e o número de indivíduos que apresentaram crescimento microbiano, verifica-se que a incidência das espécies se manteve semelhante aos dados gerais do estudo. *C. albicans* foi a espécie mais comumente encontrada, seguida de *C. tropicalis* nos grupos controle e Cloramina T (prótese e palato) e Hipoclorito de sódio (prótese). Para o grupo do *R. communis*, *C. glabrata* foi mais frequente que *C. tropicalis*, independente do sítio de coleta e para o Hipoclorito de sódio a 0,25%, as amostras do palato dos participantes foram, em sua maioria, de *C. tropicalis*, seguida de *C. albicans* e *C. glabrata*, que foram iguais. *C. krusei* foi isolada somente no grupo controle.

O grupo Hipoclorito de sódio apresentou, no geral, redução na incidência de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* das amostras da prótese e mucosa palatal nos períodos de 7 e 37 dias quando comparados com os achados do *Baseline*. A Cloramina T, por sua vez, promoveu redução das espécies de *Candida* somente para as próteses totais em comparação ao *Baseline*; para as amostras da mucosa palatina, houve aumento após iniciado o período experimental e/ou ausência de alteração.

O *R. communis* promoveu redução da incidência de *C. tropicalis* em ambos os sítios de coleta. Em contraste, o aparecimento de *C. albicans* e *C. glabrata* após 37 dias do estudo permaneceu igual ao *Baseline*. No grupo controle, o mesmo ocorreu para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e outras espécies coletadas tanto na prótese, quanto no palato. A Tabela 5 apresenta a porcentagem, bem como o número de indivíduos de cada grupo de soluções que apresentaram as diferentes espécies de *Candida* ao longo do período experimental.

Tabela 5 - Porcentagem (%) e frequência de indivíduos (Fr) que apresentaram as diferentes espécies de *Candida* ao longo do período experimental, de acordo com as soluções desinfetantes, sítio e período de coleta.

Grupo	<i>Candida</i> spp.	PRÓTESE						PALATO					
		Baseline		7 dias		37 dias		Baseline		7 dias		37 dias	
		%	Fr	%	Fr	%	Fr	%	Fr	%	Fr	%	Fr
Salina	<i>C. albicans</i>	66,7	10	46,7	7	66,7	10	20,0	3	13,3	2	20,0	3
	<i>C. tropicalis</i>	20,0	3	20,0	3	20,0	3	13,3	2	20,0	3	13,3	2
	<i>C. glabrata</i>	13,3	2	6,7	1	6,7	1	0,0	0	0,0	0	6,7	1
	<i>C. krusei</i>	6,7	1	0,0	0	6,7	1	6,7	1	6,7	1	6,7	1
	Outras	6,7	1	6,7	1	6,7	1	6,7	1	6,7	1	6,7	1
	Nenhuma	13,3	2	40,0	6	20,0	3	60,0	9	66,7	10	53,3	8
HS 0,25%	<i>C. albicans</i>	73,3	11	26,7	4	33,3	5	20,0	3	20,0	3	6,7	1
	<i>C. tropicalis</i>	33,3	5	20,0	3	13,3	2	33,3	5	26,7	4	20,0	3
	<i>C. glabrata</i>	26,7	4	6,7	1	20,0	3	20,0	3	13,3	2	13,3	2
	<i>C. krusei</i>	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0
	Outras	6,7	1	6,7	1	0,0	0	6,7	1	13,3	2	6,7	1
	Nenhuma	20,0	3	66,7	10	60,0	9	46,7	7	60,0	9	66,7	10
RC 10%	<i>C. albicans</i>	80,0	12	86,7	13	80,0	12	20,0	3	40,0	6	46,7	7
	<i>C. tropicalis</i>	26,7	4	13,3	2	20,0	3	6,7	1	6,7	1	0,0	0
	<i>C. glabrata</i>	33,3	5	26,7	4	33,3	5	6,7	1	6,7	1	20,0	3
	<i>C. krusei</i>	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0
	Outras	0,0	0	0,0	0	0,0	0	6,7	1	0,0	0	0,0	0
	Nenhuma	13,3	2	13,3	2	13,3	2	73,3	11	60,0	9	53,3	8
CT 0,5%	<i>C. albicans</i>	80,0	12	73,3	11	73,3	11	40,0	6	20,0	3	40,0	6
	<i>C. tropicalis</i>	33,3	5	20,0	3	20,0	3	6,7	1	13,3	2	20,0	3
	<i>C. glabrata</i>	20,0	3	6,7	1	6,7	1	13,3	2	6,7	1	6,7	1
	<i>C. krusei</i>	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0
	Outras	13,3	2	0,0	0	6,7	1	0,0	0	6,7	1	6,7	1
	Nenhuma	13,3	2	26,7	4	20,0	3	53,3	8	66,7	10	53,3	8

4.1.4. Avaliação do efeito das soluções desinfetantes sobre o crescimento das espécies de *Candida*.

As tabelas 6 e 7 apresentam a contagem de UFC/mL em log₁₀ (UFC + 1), assim como as espécies de *Candida* identificadas na superfície interna das próteses totais superiores e palato dos participantes, no *Baseline* e após instituição dos protocolos de higiene (7 e 37 dias).

Tabela 6 - Contagem de UFC/mL em log₁₀ (UFC + 1) e identificação das *Candida* spp. coletadas da superfície interna da prótese total superior.

Grupo	Participante	PRÓTESE					
		Baseline		7 dias		37 dias	
		UFC	Espécies	UFC	Espécies	UFC	Espécies
Salina	1	4,45	<i>C.a/ C.t</i>	4,00	<i>C.a/C.t</i>	4,41	<i>C.a/C.t</i>
	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	6	4,60	<i>C.a</i>	3,62	<i>C.a</i>	2,98	<i>C.a</i>
	9	4,30	<i>C.t</i>	4,17	<i>C.t</i>	4,76	<i>C.t</i>
	10	2,08	<i>C.k</i>	1,61	<i>C.a</i>	1,61	<i>C.k</i>
	14	5,65	<i>C.a/C.g</i>	4,12	<i>C.a</i>	3,63	<i>C.a</i>
	17	4,80	<i>C.a</i>	4,91	<i>C.a</i>	5,02	<i>C.a</i>
	22	3,42	<i>C.a</i>	4,05	<i>C.a</i>	3,70	<i>C.a</i>
	29	3,21	<i>C.a</i>	0,00	0	3,36	<i>C.a</i>
	37	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	43	4,38	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	48	4,73	<i>C.t/C.g/Outras</i>	5,37	<i>C.t/C.g/Outras</i>	5,37	<i>C.a/C.t/C.g/Outras</i>
	49	2,58	<i>C.a</i>	0,00	0	3,31	<i>C.a</i>
	52	5,39	<i>C.a</i>	4,38	<i>C.a</i>	5,11	<i>C.a</i>
	58	4,81	<i>C.a</i>	0,00	0	1,32	<i>C.a</i>
HS 0,25%	4	3,37	<i>C.t</i>	0,00	0	1,61	<i>C.a/C.g</i>
	12	4,62	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	13	4,11	<i>C.a/C.t/C.g</i>	4,62	<i>C.a/C.t</i>	1,32	<i>C.g</i>
	18	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	19	4,24	<i>C.a/C.g</i>	0,00	0	0,00	0
	21	6,31	<i>C.a/C.t/C.g</i>	0,00	0	1,32	<i>C.a</i>
	26	0,00	0	1,32	Outras	0,00	0
	28	3,67	<i>C.a</i>	2,75	<i>C.a</i>	3,95	<i>C.a</i>
	30	1,91	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	31	5,22	<i>C.a/C.t</i>	3,54	<i>C.a/C.t</i>	4,61	<i>C.a/C.t</i>
	34	4,83	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	41	4,53	<i>C.a/C.t/C.g/Outras</i>	2,78	<i>C.a/C.t/C.g</i>	3,23	<i>C.a/C.t/C.g</i>
	42	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	44	3,41	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	50	4,13	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
RC 10%	3	2,34	<i>C.a</i>	3,97	<i>C.a</i>	4,25	<i>C.a</i>
	5	3,60	<i>C.a</i>	4,58	<i>C.a</i>	4,53	<i>C.a</i>
	11	5,18	<i>C.a/C.t</i>	4,37	<i>C.a</i>	4,54	<i>C.a</i>
	24	3,05	<i>C.t</i>	0,00	0	2,62	<i>C.t</i>
	25	0,00	0	3,65	<i>C.a/C.g</i>	5,17	<i>C.a/C.g</i>
	27	3,82	<i>C.a/C.g</i>	3,83	<i>C.a/C.g</i>	3,22	<i>C.a/C.t/C.g</i>
	36	5,62	<i>C.a/C.g</i>	4,60	<i>C.a</i>	5,77	<i>C.a</i>
	38	5,93	<i>C.a/C.g</i>	4,78	<i>C.a/C.g</i>	5,37	<i>C.a/C.g</i>
	39	3,67	<i>C.a</i>	4,38	<i>C.a</i>	3,82	<i>C.a</i>
	40	4,87	<i>C.a/C.t/C.g</i>	2,21	<i>C.a/C.t</i>	4,34	<i>C.a/C.g</i>
	45	5,16	<i>C.a</i>	1,32	<i>C.a</i>	0,00	0
	47	3,22	<i>C.a/C.t</i>	4,49	<i>C.a/C.t</i>	4,61	<i>C.a/C.t</i>
	51	4,41	<i>C.a</i>	4,55	<i>C.a</i>	4,03	<i>C.a</i>
	53	5,44	<i>C.a/C.g</i>	5,11	<i>C.a/C.g</i>	4,50	<i>C.a/C.g</i>
	59	0,00	0	0,00	0	0,00	0
CT 0,5%	7	3,63	<i>C.t/Outras</i>	0,00	0	0,00	0
	8	4,28	<i>C.a</i>	3,18	<i>C.a</i>	2,76	<i>C.a</i>
	15	4,71	<i>C.a</i>	3,43	<i>C.a</i>	5,82	<i>C.a</i>
	16	4,87	<i>C.a</i>	3,31	<i>C.a</i>	4,85	<i>C.a</i>
	20	4,76	<i>C.a/C.t</i>	4,72	<i>C.a/C.t</i>	4,49	<i>C.a/C.t</i>

23	5,64	<i>C.a/C.t/C.g</i>	4,91	<i>C.a/C.t</i>	4,24	<i>C.a/C.t</i>
32	1,91	<i>C.a</i>	3,60	<i>C.a</i>	5,62	<i>C.a</i>
33	0,00	0	0,00	0	0,00	0
35	4,84	<i>C.a/C.t</i>	3,53	<i>C.a</i>	4,06	<i>C.a</i>
46	5,67	<i>C.a/C.t</i>	4,79	<i>C.a/C.t</i>	4,60	<i>C.a/C.t</i>
54	1,79	<i>C.a/C.g</i>	3,36	<i>C.a/C.g</i>	3,19	<i>C.g</i>
55	5,49	<i>C.a/C.g/Outras</i>	0,00	0	3,29	<i>C.a/Outras</i>
56	4,83	<i>C.a</i>	1,32	<i>C.a</i>	1,79	<i>C.a</i>
57	4,94	<i>C.a</i>	3,51	<i>C.a</i>	1,32	<i>C.a</i>
60	0,00	0	0,00	0	0,00	0

**C.a*: *Candida albicans*; *C.t*: *Candida tropicalis*; *C.g*: *Candida glabrata*; *C.k*: *Candida krusei*; Outras: Outras espécies de *Candida*.

Tabela 7 - Contagem de UFC/mL em log₁₀ (UFC + 1) e identificação das *Candida* spp. coletadas do palato.

Grupo	Participante	PALATO					
		Baseline		7 dias		37 dias	
		UFC	Espécies	UFC	Espécies	UFC	Espécies
Salina	1	1,91	<i>C.a</i>	0,00	0	4,35	<i>C.t</i>
	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	6	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	9	3,19	<i>C.t</i>	2,08	<i>C.t</i>	0,00	0
	10	4,26	<i>C.k</i>	3,36	<i>C.t/C.k</i>	4,86	<i>C.k</i>
	14	2,34	<i>C.a</i>	0,00	0	1,61	<i>C.a</i>
	17	0,00	0	1,32	<i>C.a</i>	0,00	0
	22	1,61	<i>C.a</i>	0,00	0	2,21	<i>C.a</i>
	29	0,00	0	0,00	0	1,61	<i>C.g/Outras</i>
	37	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	43	0,00	0	1,61	<i>C.a</i>	1,32	<i>C.a</i>
	48	3,74	<i>C.t/Outras</i>	4,67	<i>C.t/Outras</i>	5,25	<i>C.t</i>
	49	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	52	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	58	0,00	0	0,00	0	0,00	0
HS 0,25%	4	5,14	<i>C.t</i>	3,83	<i>C.t</i>	5,41	<i>C.t</i>
	12	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	13	2,26	<i>C.a/C.t/C.g</i>	1,61	<i>C.a</i>	0,00	0
	18	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	19	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	21	3,39	<i>C.t/C.g</i>	4,63	<i>C.a/C.t/C.g</i>	2,34	<i>C.a/C.g</i>
	26	1,32	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	28	1,32	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	30	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	31	4,47	<i>C.t</i>	2,00	<i>C.t</i>	4,91	<i>C.t</i>
	34	4,11	<i>C.t</i>	3,66	<i>C.t/Outras</i>	4,61	<i>C.t</i>
	41	2,48	<i>C.g/Outras</i>	3,71	<i>C.a/C.g/Outras</i>	3,73	<i>C.g/Outras</i>
	42	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	44	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	50	0,00	0	0,00	0	0,00	0
RC 10%	3	4,75	<i>C.t/Outras</i>	0,00	0	0,00	0
	5	2,15	<i>C.a</i>	2,18	<i>C.a</i>	2,70	<i>C.a</i>
	11	0,00	0	0,00	0	2,53	<i>C.a</i>
	24	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	25	0,00	0	1,32	<i>C.a</i>	1,61	<i>C.a</i>
	27	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	36	0,00	0	1,91	<i>C.a</i>	3,03	<i>C.a</i>

CT 0,5%	38	1,32	<i>C.a</i>	0,00	0	2,81	<i>C.a/C.g</i>
	39	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	40	0,00	0	0,00	0	2,15	<i>C.a/C.g</i>
	45	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	47	0,00	0	2,30	<i>C.a/C.t</i>	0,00	0
	51	0,00	0	1,32	<i>C.a</i>	0,00	0
	53	3,73	<i>C.a/C.g</i>	3,34	<i>C.a/C.g</i>	1,91	<i>C.a/C.g</i>
	59	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	7	0,00	0	2,92	<i>C.t/Outras</i>	3,30	<i>C.t/Outras</i>
	8	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	15	1,32	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	16	1,32	<i>C.a</i>	0,00	0	1,32	<i>C.a</i>
	20	3,74	<i>C.a/C.t</i>	2,62	<i>C.t</i>	3,22	<i>C.a/C.t</i>
	23	0,00	0	3,23	<i>C.a</i>	2,00	<i>C.a</i>
	32	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	33	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	35	1,79	<i>C.a</i>	1,61	<i>C.a</i>	0,00	0
	46	0,00	0	0,00	0	0,00	0
	54	4,53	<i>C.a/C.g</i>	4,22	<i>C.a/C.g</i>	2,08	<i>C.a/C.t/C.g</i>
	55	3,16	<i>C.g</i>	0,00	0	2,38	<i>C.a</i>
	56	0,00	0	0,00	0	1,32	<i>C.a</i>
	57	3,30	<i>C.a</i>	0,00	0	0,00	0
	60	0,00	0	0,00	0	0,00	0

**C.a*: *Candida albicans*; *C.t*: *Candida tropicalis*; *C.g*: *Candida glabrata*; *C.k*: *Candida krusei*; Outras: Outras espécies de *Candida*

A análise estatística dos dados indicou que a quantidade de UFC foi solução X tempo dependente para as amostras da prótese. No *Baseline*, não houve diferença estatística significativa entre a quantidade de UFC encontrada nos grupos, evidenciando a semelhança entre os participantes previamente à aplicação dos protocolos de higiene. No entanto, após 7 e 37 dias, houve diferença significativa na contagem de UFC do grupo Hipoclorito de sódio à 0,25% e os demais, os quais não apresentaram diferença estatística entre si. Ao longo do período experimental, verifica-se que o Hipoclorito de sódio a 0,25% e a Cloramina T a 0,5% causaram redução significativa na contagem de UFC se comparado ao *Baseline*. As soluções salina e *R. communis* a 10% não influenciaram a contagem de UFC ao longo do tempo (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação das medianas e intervalos de confiança (IC) da contagem de UFC+1 (Log₁₀) das próteses, no *Baseline* e após o uso das soluções desinfetantes e salina (controle).

Grupos	<i>Baseline</i>	7 dias	37 dias	p**
Controle	4,38 (2,65; 4,61) ^{A,a}	3,62 (1,20; 3,63) ^{A,a}	3,36 (1,90; 4,04) ^{A,a}	0,138
HS 0,25%	4,11 (2,26; 4,46) ^{A,a}	0,00 (0,11; 1,89) ^{B,b}	0,00 (0,18; 1,96) ^{B,b}	0,002
RC 10%	3,82 (2,73; 4,78) ^{A,a}	4,37 (2,50; 4,41) ^{A,a}	4,34 (2,83; 4,74) ^{A,a}	0,931
CT 0,5%	4,76 (2,75; 4,90) ^{A,a}	3,36 (1,62; 3,67) ^{A,b}	3,29 (1,95; 4,19) ^{A,ab}	0,023
p*	0,672	0,008	0,004	

* teste de Kruskal-Wallis, pós-teste stepwise step-down; ^{AB} letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre linhas.

** teste de Friedman, pós-teste stepwise step-down; ^{ab} letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre colunas.

Para o palato, o uso das soluções ou os períodos de tempo analisados não influenciaram a quantidade de UFC de *Candida* spp. (Tabela 9).

Tabela 9 - Mediana (IC) da contagem de UFC+1 (Log₁₀) do palato, no *Baseline* e após o uso das soluções desinfetantes e salina (controle).

Grupos	<i>Baseline</i>	7 dias	37 dias	p**
Controle	0,00 (0,27; 2,01)	0,00 (0,05; 1,69)	0,00 (0,35; 2,48)	0,318
HS 0,25%	1,32 (0,59; 2,67)	0,00 (0,31; 2,29)	0,00 (0,21; 2,59)	0,393
RC 10%	0,00 (-0,06; 1,65)	0,00 (0,19; 1,45)	0,00 (0,41; 1,83)	0,293
CT 0,5%	0,00 (0,37; 2,18)	0,00 (0,14; 1,81)	0,00 (0,34; 1,74)	0,205
p*	0,524	0,924	0,993	

* teste de Kruskal-Wallis; ** teste de Friedman.

4.2. ESTUDO IN VITRO

4.2.1. Efeito das soluções sobre o crescimento microbiano das espécies de *Candida*

A tabela 10 apresenta a contagem de UFC+1 (log₁₀) das espécies de *Candida* spp. após imersão nas soluções desinfetantes e controle.

Tabela 10 - Contagem de UFC+1/mL (log₁₀) de *Candida* spp. após imersão nas soluções desinfetantes e controle.

n	C	<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>				<i>C. glabrata</i>			
		HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%
1	4,38	0,00	3,96	3,68	5,70	0,00	5,72	3,41	6,26	0,00	5,56	0,00
2	4,58	0,00	3,77	4,13	5,75	0,00	6,05	3,74	6,55	0,00	5,51	0,00
3	4,27	0,00	5,18	3,37	6,33	0,00	6,06	4,06	6,29	0,00	5,17	0,00
4	5,55	0,00	4,25	3,89	5,81	0,00	5,05	4,65	6,75	0,00	4,66	0,00
5	4,73	0,00	4,96	3,62	5,51	0,00	4,81	5,37	6,43	0,00	6,11	1,61
6	4,64	0,00	3,92	4,37	5,89	0,00	5,63	5,07	6,41	0,00	5,73	1,61
7	4,94	0,00	3,57	2,38	5,75	0,00	5,11	3,70	6,46	0,00	4,88	3,93
8	5,35	0,00	4,58	3,19	5,31	0,00	4,89	4,09	6,19	0,00	5,21	2,64
9	4,25	0,00	3,91	2,45	5,39	0,00	5,39	2,88	6,01	0,00	5,21	1,61

Maurício Malheiros Badaró

A comparação das médias (DP) (Tabela 11) indicou efetividade do Hipoclorito de sódio contra todas as espécies de *Candida*, uma vez que não houve crescimento de colônias ou turvação do meio de cultura. Entre as demais soluções, a Cloramina T causou redução significativa no número de UFC para todas as espécies de *Candida* quando comparada ao *R. communis* e grupo controle. O *R. communis* reduziu a quantidade de UFC de *C. glabrata* quando comparada ao controle.

Tabela 11 - Comparação das médias e desvio padrão (DP) de UFC+1/mL ($\log_{10}$) de *Candida* spp. após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e controle.

Grupos	<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. glabrata</i>	
	UFC	Turvação	UFC	Turvação	UFC	Turvação
Controle	4,74±0,46 ^A	(+)	5,72±0,30 ^A	(+)	6,37±0,22 ^A	(+)
HS 0,25%	0*	(-)	0*	(-)	0*	(-)
RC 10%	4,23±0,56 ^A	(+)	5,41±0,48 ^A	(+)	5,34±0,44 ^B	(+)
CT 0,5%	3,45±0,69 ^B	(+)	4,11±0,80 ^B	(+)	1,27±1,40 ^C	(+)
p**	<0,001		<0,001		<0,001	

*O Hipoclorito de sódio (HS 0,25%) reduziu a zero o número de UFC. ** Anova (one-way); pós-teste de Tukey;

^{AB} letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre linhas. Sinal (+) indica turvação do meio e sinal (-) indica ausência de turvação.

4.2.2. Efeito das soluções desinfetantes sobre o metabolismo celular

A tabela 12 apresenta os valores de absorbância representativa da atividade metabólica das espécies de *Candida*.

Tabela 12 – Valores de absorbância após imersão dos espécimes com biofilme de *Candida* spp. nas soluções desinfetantes e controle.

<i>C. albicans</i>					<i>C. tropicalis</i>				<i>C. glabrata</i>			
N	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%
1	0,11	0	0,12	0,06	0,77	0	0,85	0,37	0,21	0	0,03	0
2	0,11	0	0,01	0,01	0,6	0	0,21	0,33	0,1	0	0,13	0
3	0,11	0	0,01	0,01	0,86	0	0,4	0,37	0,21	0	0,01	0,01
4	0,06	0	0,02	0,01	0,89	0	0,22	0,15	0,26	-0,01	0,03	0,01
5	0,08	0	0,01	0,01	0,83	0	0,06	0,48	0,23	0	0,07	0,01
6	0,05	0	0,02	0,01	0,96	0	0,12	0,19	0,51	0	0,03	0
7	0,16	0	0,05	0,03	0,79	-0,01	0,39	0,56	0,17	-0,01	0,06	0,01
8	0,11	0	0,07	0,01	0,86	0	0,79	0,3	0,07	-0,01	0,02	0
9	0,18	0	0,04	0	0,89	0	0,1	0,71	0,39	0	0,01	0,01

A comparação das medianas (IC) indicou que o Hipoclorito de sódio à 0,25% reduziu a zero (0) a atividade metabólica de todas as espécies de *Candida*. As soluções de *R. communis* e Cloramina T causaram diminuição significativa da atividade metabólica de todas

as espécies de *Candida*, quando comparadas ao controle. A Cloramina T apresentou melhores resultados para *C. tropicalis* quando comparada ao *R. communis* (Tabela 13).

Tabela 13 - Mediana (IC) dos valores de absorvância após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e controle.

Grupos	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
C	0,11(0,08;0,14) ^A	0,21(0,13;0,34) ^A	0,83±0,10 ^A
HS 0,25%	0*	0*	0*
RC 10%	0,02(0,01;0,07) ^B	0,03(0,01;0,07) ^B	0,35±0,29 ^B
CT 0,5%	0,01(0,00;0,03) ^B	0,01(0,00;0,01) ^C	0,38±0,18 ^B
P	<0,001***	<0,001***	<0,001**

*o Hipoclorito reduziu a zero a atividade metabólica.

** Anova (one-way), pós-teste de Tukey; *** Kruskal-Wallis, pós-teste de stepwise step-down; ^{AB} letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre linhas.

4.2.3. Efeito das soluções desinfetantes sobre a produção de enzimas hidrolíticas

▪ *Proteinase*

A tabela 14 apresenta os valores da produção de proteinase (µg/mL) das *Candida* spp. após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e controle.

Tabela 14 - Valores da produção de proteinase (µg/mL) pelas *Candida* spp. após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e controle.

n	<i>C. albicans</i>				<i>C. tropicalis</i>				<i>C. glabrata</i>			
	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%
1	2,41	1,82	1,93	1,91	2,17	3,38	2,01	2,53	1,80	2,08	1,84	1,90
2	2,05	2,05	2,72	2,19	1,91	3,60	2,03	3,41	1,86	1,97	1,94	2,03
3	2,29	2,14	2,22	2,90	2,14	3,38	2,11	4,51	1,77	1,98	1,88	1,96
4	1,64	1,01	1,33	1,52	1,51	1,47	1,51	1,56	1,65	1,06	1,65	1,74
5	1,56	1,66	1,59	1,59	1,52	1,44	1,55	1,50	1,65	3,95	1,97	1,78
6	1,72	1,45	1,61	1,49	1,45	1,51	1,57	1,51	1,60	1,76	1,80	1,83
7	3,13	3,15	3,33	2,67	1,83	1,65	1,80	1,89	1,71	2,38	1,77	1,83
8	3,15	3,13	3,09	2,46	1,79	1,81	1,73	2,58	1,73	1,81	1,80	1,86
9	2,85	3,22	3,20	3,03	1,82	1,85	1,79	1,86	1,78	2,91	1,81	1,86

A análise estatística não indicou diferença significativa na produção de proteinase pelas espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* após exposição às diferentes soluções desinfetantes. Em contraste, houve aumento significativo da produção desta enzima por *C. glabrata* para todas as soluções desinfetantes, que foram iguais entre si e diferentes do grupo controle (Tabela 15).

Tabela 15 – Medianas (IC) da produção de proteinase ($\mu\text{g/mL}$) pelas espécies de *Candida* após imersão dos corpos de prova nas soluções e na água (Controle).

Grupos	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
C	2,3 (1,8;2,8)	1,8 (1,6;2,0)	1,7 (1,7;1,8) ^A
HS 0,25%	2,0 (1,6;2,8)	1,8 (1,5;2,9)	2,0 (1,6;2,8) ^B
RC 10%	2,2 (1,7;2,9)	1,8 (1,6;2,0)	1,8 (1,8;1,9) ^B
CT 0,5%	2,2 (1,7;2,7)	1,9 (1,6;3,1)	1,9 (1,8;1,9) ^B
p*	0,923	0,718	0,012

*Teste de Kruskal-Wallis; ^{AB} letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre linhas

(pós-teste de stepwise step-down).

▪ Fosfolipase

A tabela 16 apresenta os valores de fosfolipase (10^{-3}U/mL) produzida pelas espécies de *Candida* após imersão dos corpos de prova nas soluções desinfetantes e controle.

Tabela 16 - Valores de fosfolipase (10^{-3}U/mL) produzida pelas espécies de *Candida* após imersão dos corpos de prova nas soluções desinfetantes e controle.

n	<i>C. albicans</i>				<i>C. tropicalis</i>				<i>C. glabrata</i>			
	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%
1	5,1	6,3	5,8	6,5	6,5	6,6	5,7	5,9	6,4	6,1	6,4	7,9
2	4,8	5,6	5,7	5,4	5,4	6,4	8,6	5,7	5,8	6,3	6,3	7,4
3	4,6	4,9	5,6	5,3	6,1	6,7	7,3	5,4	6,3	6,1	6,4	7,7
4	8	7,5	7,3	7,6	7,3	9,1	6,9	8,2	2,1	2	2,6	2,5
5	7,6	6,3	7,2	7,5	7,2	8,9	7,1	7,5	2,4	2,3	2,4	2,7
6	9	8,9	8	8,6	6,6	10,1	7	7,3	2,5	2,6	2,2	2,3
7	5,2	5,73	5,31	0,5	2,3	3,5	2,8	2,8	2,1	2,5	2,3	2,4
8	5,96	5,86	6,05	5,9	2,9	3	2,8	3,1	2,3	3,1	2,3	2,4
9	6,13	6,1	5,83	5,65	2,6	2,9	2,7	3,3	2,4	2,5	2,4	2,5

A comparação das medianas (IC) indicou que as soluções desinfetantes não influenciaram a produção de fosfolipase pelas espécies de *Candida* (Tabela 17).

Tabela 17 – Medianas (IC) da produção de fosfolipase (10^{-3}U/mL) pelas espécies de *Candida* após imersão dos espécimes nas soluções e na água (Controle).

Grupos	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
C	5,9 (5,0;7,5)	6,1 (3,6;6,8)	2,4 (2,1;5,1)
HS 0,25%	6,1 (5,4;7,3)	6,6 (4,2;8,5)	2,6 (2,3;5,2)
RC 10%	5,8 (5,6;7,0)	5,8 (5,6;7,0)	2,4 (2,2;5,2)
CT 0,5%	5,9 (4,1;7,7)	5,7 (3,9;7,0)	2,5 (2,2;6,2)
p*	0,977	0,639	0,536

*Teste de Kruskal-Wallis

4.2.4. Efeito das soluções desinfetantes sobre a formação de hifas

A tabela 18 apresenta os valores de contagem de células em formato de hifas de *C. albicans* e *C. tropicalis* após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e controle.

Tabela 18 - Contagem de células em formato de hifas (10^6 células/mL) de *Candida* spp. após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e controle.

n	<i>C. albicans</i>				<i>C. tropicalis</i>			
	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%	C	HS 0,25%	RC 10%	CT 0,5%
1	4,6	0	4,9	3,2	5,0	0	3,8	0,9
2	7,1	0	1,7	3,9	4,4	0	4	0,8
3	5,9	0	7,7	2,3	3,1	0	4,2	0,9
4	1,15	0	1,12	1,27	0,6	0	0,4	0,27
5	0,95	0	0,82	0,15	0,47	0	0,6	0,27
6	0,92	0	1,57	0,62	0,52	0	0,27	0,3
7	1,2	0	1,0	0,62	0,6	0	0,3	0,65
8	0,27	0	0,95	0,52	0,85	0	0,22	0,3
9	0,72	0	1,05	0,62	0,72	0	0,92	0,32

O Hipoclorito de sódio a 0,25% reduziu à zero a formação de células em forma de hifas. As demais soluções não tiveram efeito significativo apresentando resultados estatisticamente semelhantes ao controle. Cabe destacar que o grupo da Cloramina T a 0,5% apresentou valores do intervalo de confiança consideravelmente menores que os grupos controle e *R. communis* a 10% (Tabela 19).

Tabela 19 - Mediana (IC) das contagens de células ($\times 10^6$ células/mL) em forma de hifas de *Candida* spp. após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e controle.

	Controle	RC 10%	CT 0,5%	p
<i>C. albicans</i>	1,15 (0,55; 4,53)	1,125 (0,482; 4,146)	0,625 (0,438; 2,5)	0,357*
<i>C. tropicalis</i>	0,725 (0,4; 3,221)	0,6 (0,261; 3,01)	0,525 (0,31; 0,742)	0,214*

*Teste de Kruskal-Wallis

4.2.5. Efeito das soluções quanto à capacidade de remoção do biofilme e contagem de células vivas

As tabelas 20, 21 e 22 apresentam as porcentagens das áreas totais analisadas nos espécimes recobertas por biofilme vivo e biofilme total.

Tabela 20 – Área (%) recoberta por biofilme vivo e biofilme total de *C. albicans* após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e no controle.

Controle		HS 0,25%		RC 10%		CT 0,5%	
Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total
58,23	58,69	0,00	13,41	0,00	0,25	1,37	7,18
65,23	65,98	0,00	8,59	0,03	0,26	0,00	4,70
67,73	69,47	0,00	5,07	14,99	17,39	0,00	16,94
68,02	68,21	0,00	6,10	15,70	18,93	0,00	2,10
71,89	72,36	0,00	7,44	9,07	9,07	0,50	2,89
60,56	61,88	0,00	1,32	8,34	8,77	0,00	6,02
55,02	56,09	0,00	1,39	16,20	16,54	0,00	6,27
74,31	75,57	0,00	3,46	24,04	28,00	0,97	5,35
28,81	29,01	0,00	1,56	9,89	10,96	0,00	9,37
37,30	37,30	0,00	1,60	8,94	9,68	0,19	1,73
38,27	38,27	0,00	0,36	9,43	9,87	1,25	6,60
73,89	74,22	0,00	6,27	5,82	5,86	0,00	3,83
56,75	56,75	0,00	3,28	14,03	14,04	0,00	20,36
63,04	63,12	0,00	4,48	4,08	4,89	0,00	14,05
59,00	59,78	0,00	3,71	6,09	9,28	0,00	4,55
32,97	33,27	0,00	3,18	11,04	11,22	2,28	7,92
18,40	18,40	0,00	1,49	17,13	20,82	0,00	21,92
11,55	19,89	0,00	1,50	20,34	24,06	0,03	0,42
19,32	19,32	0,00	1,55	11,03	11,28	1,27	1,54
45,83	48,64	0,00	0,82	0,03	0,42	0,93	3,09

Tabela 21 – Área (%) recoberta por biofilme vivo e biofilme total de *C. tropicalis* após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e no controle.

Controle		HS 0,25%		RC 10%		CT 0,5%	
Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total
11,03	11,24	0,00	0,30	5,58	7,11	0,00	0,43
14,11	14,47	0,00	3,28	4,82	6,03	0,00	0,91
11,52	11,84	0,00	1,27	6,94	9,44	0,00	3,17
20,01	20,52	0,00	1,11	7,47	8,60	0,00	0,65
18,33	19,16	0,00	0,67	6,37	7,52	0,00	0,34
15,60	16,02	0,00	1,41	9,82	12,53	0,00	1,39
18,38	19,47	0,00	0,33	6,20	7,11	0,00	1,18
18,22	19,10	0,00	5,49	8,40	9,48	0,00	2,01
16,75	17,45	0,00	1,71	4,75	8,33	0,13	0,36
15,09	16,89	0,00	1,91	4,23	7,48	0,00	1,90
15,05	15,91	0,00	1,30	8,76	10,65	0,03	0,64
7,41	15,12	0,00	1,29	3,35	6,52	0,00	1,85
9,15	12,69	0,00	1,05	7,89	8,88	0,04	2,11
9,12	12,04	0,00	0,49	6,81	7,51	0,00	0,95
9,79	10,94	0,00	0,95	8,22	8,61	0,00	1,58
19,76	20,72	0,00	0,82	10,95	11,78	0,00	2,34
13,94	15,76	0,00	0,69	6,81	7,52	0,00	3,54
11,44	11,47	0,00	0,88	3,65	5,77	0,00	2,38
8,85	9,11	0,00	0,62	5,19	5,77	0,46	1,64
9,41	9,63	0,00	0,06	7,14	8,52	0,00	1,87

Tabela 22 – Área (%) recoberta por biofilme vivo e biofilme total de *C. glabrata* após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e no controle.

Controle		HS 0,25%		RC 10%		CT 0,5%	
Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total	Biofilme vivo	Biofilme total
3,65	37,51	0,00	0,26	3,46	4,06	0,00	7,77
6,11	42,80	0,00	0,10	1,26	3,29	0,00	3,29
5,35	46,22	0,00	0,61	0,00	2,90	0,00	13,98
2,06	47,28	0,00	0,19	1,87	4,26	0,00	12,50
32,33	35,41	0,00	0,55	0,19	3,14	0,44	14,90
26,18	29,76	0,00	0,61	0,00	5,71	5,87	19,35
6,44	35,13	0,00	0,11	0,23	2,41	4,57	10,21
20,63	41,90	0,00	0,32	0,31	2,32	3,36	12,23
12,57	60,84	0,00	0,10	0,00	4,10	10,18	30,33
13,19	48,55	0,00	0,00	0,00	5,92	0,00	18,83
3,96	39,45	0,00	0,00	0,00	4,78	0,00	33,35
28,07	33,48	0,00	0,00	0,78	4,61	7,54	14,56
20,17	34,79	0,00	0,00	0,00	3,63	4,57	23,78
24,58	42,68	0,00	0,00	2,85	5,59	5,62	33,36
11,61	35,12	0,00	0,00	0,00	3,75	0,00	35,33
24,08	32,84	0,00	0,00	0,33	4,34	0,00	24,48
20,24	36,86	0,00	0,00	2,45	4,34	0,00	30,65
18,12	27,97	0,00	0,00	1,58	2,50	0,00	39,80
23,69	27,76	0,00	0,00	0,48	2,89	5,42	19,55
18,43	30,90	0,00	0,00	3,36	4,78	4,45	19,93

A comparação das medianas (IC) demonstrou diferenças significativas entre todas as soluções para cada espécie de *Candida*. A imersão dos espécimes em Hipoclorito de sódio a 0,25% reduziu a zero (0) a quantidade de células vivas. A Cloramina T e o *R. communis* apresentaram resultados intermediários entre Hipoclorito de sódio e água (controle), sendo diferentes entre si para *C. albicans* e *C. tropicalis*, com maior eficácia da Cloramina T. Estas duas soluções apresentaram resultados semelhantes para *C. glabrata*. A maior quantidade de células vivas foi encontrada no grupo controle (água) para todas as espécies de *Candida* analisadas (Tabela 23).

Com relação à capacidade de remoção de biofilme, o grupo de espécimes imersos em Hipoclorito de sódio apresentou a menor área recoberta por biofilme e o grupo controle, a maior. A solução de *R. communis* reduziu de forma significativa a quantidade de biofilme de todas as espécies analisadas quando comparado à água. A Cloramina T foi mais eficiente que o *R. communis* para remoção do biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis* e menos eficiente para remoção de biofilme de *C. glabrata*. *R. communis* e Hipoclorito de sódio apresentaram melhores resultados que a água e Cloramina T contra esta espécie de *Candida* (Tabela 23), sendo o Hipoclorito de sódio o mais eficiente.

Tabela 23 - Medianas (IC) da área do biofilme vivo e área total de biofilme, em porcentagem, após imersão dos espécimes nas soluções desinfetantes e controle.

Grupos	<i>C. albicans</i>		p**	<i>C. tropicalis</i>		p**	<i>C. glabrata</i>		p**
	Biofilme vivo	Biofilme total		Biofilme vivo	Biofilme total		Biofilme vivo	Biofilme total	
Água	57,5 ^{Aa} (41,0;59,6)	57,72 ^{Ab} (42,3;60,4)	0,001	14,0 ^{Aa} (11,7;15,5)	15,4 ^{Ab} (13,2;16,7)	0,000	18,3 ^{Aa} (11,8;20,4)	36,1 ^{Ab} (34,6;42,2)	0,00
HS	0 (-;-)† ^a	3,23 ^{Db} (2,3;5,4)	0,000	0 (-;-)† ^a	1,0 ^{Cb} (0,7;1,8)	0,000	0 (-;-)† ^a	0,0 ^{Db} (0,04;0,2)	0,008
0,25%									
RC	9,7 ^{Ba} (7,2;13,4)	10,4 ^{Bb} (8,0;15,2)	0,000	6,8 ^{Ba} (5,7;7,6)	7,9 ^{Bb} (7,4;9,1)	0,000	0,32 ^{Ba} (0,4;1,5)	4,07 ^{Cb} (3,5;4,5)	0,000
10%									
CT	0,0 ^{Ca} (0,12;0,7)	5,7 ^{Cb} (4,4;10,2)	0,000	0,0 ^{Ca} (-0,01;0,08)	1,6 ^{Cb} (1,1;2,0)	0,000	0,2 ^{Ba} (1,1;4,1)	19,45 ^{Bb} (16,2;25,7)	0,000
0,5%									
p*	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

† o higienizador reduziu a zero o biofilme. * Teste de Kruskal-Wallis. ^{AB} letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre linhas; ** Teste de Wilcoxon. ^{ab} letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre colunas.

As análises qualitativas das imagens da microscopia de epifluorescência confirmaram os achados quantitativos referentes à área total de biofilme e área de biofilme vivo. Os biofilmes das diferentes espécies de *Candida* foram removidos, em quase sua totalidade, da superfície dos espécimes após contato com o Hipoclorito de sódio e as células que permaneceram aderidas estavam mortas. Já para o grupo controle, verifica-se grande quantidade de biofilme de células vivas recobrando o corpo de prova. As imagens dos espécimes após imersão em *Ricinus communis* e Cloramina T demonstraram presença de biofilme com células vivas (coloração verde) e mortas (coloração vermelha), indicando a ação intermediária destas soluções (Figuras 25, 26 e 27).

Figura 25 - Imagens da microscopia de epifluorescência do biofilme de *Candida albicans* nos corpos de prova em resina acrílica termopolimerizável após imersão. (A) Grupo controle (água); (B) Hipoclorito de sódio a 0,25%; (C) *Ricinus communis* a 10%; (D) Cloramina T a 0,5%.

Figura 26 - Imagens da microscopia de epifluorescência do biofilme de *Candida tropicalis* nos corpos de prova em resina acrílica termopolimerizável após imersão. (A) Grupo controle (água); (B) Hipoclorito de sódio a 0,25%; (C) *Ricinus communis* a 10%; (D) Cloramina T a 0,5%.

Figura 26 - Imagens da microscopia de epifluorescência do biofilme de *Candida glabrata* nos corpos de prova em resina acrílica termopolimerizável após imersão. (A) Grupo controle (água); (B) Hipoclorito de sódio a 0,25%; (C) *Ricinus communis* a 10%; (D) Cloramina T a 0,5%.

5. Discussão

5.1 ESTUDO IN VIVO

A estomatite relacionada à prótese é uma patologia caracterizada por eritema crônico e edema de parte ou de toda a mucosa recoberta por próteses removíveis, principalmente na mucosa palatal, sendo considerada uma doença multifatorial. Dentre os fatores predisponentes e etiológicos pode ser citado o uso de próteses dentárias onde há proliferação de fungos e bactérias que pode ser exacerbada em decorrência de inadequada higienização (Budtz-Jorgensen, 1974; Hilgert et al., 2016).

Ao término da etapa in vivo desta pesquisa com participantes diagnosticados com estomatite relacionada à prótese, o aparecimento de *Candida* spp. ocorreu 301 vezes no total de culturas realizadas. A maior incidência pertenceu às amostras coletadas nos aparelhos protéticos (66%) enquanto que apenas 34% foram verificados nas amostras do palato. Portanto, estes achados confirmam que as próteses funcionam como reservatório para os micro-organismos oferecendo proteção e garantia de maior tempo de contato entre o micro-organismo e a mucosa palatal, facilitando assim, a manutenção e disseminação da estomatite relacionada à prótese (Silva-Lovato et al., 2010; Takamiya et al., 2011; Duyck et al., 2013). Menor ocorrência de leveduras isoladas do palato também foi obtida por Kabawat et al. (2014) que verificaram que 77% das culturas provenientes desta área não obtiveram crescimento de UFC. Em contrapartida, Vanden Abbeele et al. (2008) encontraram incidência de *Candida* semelhante entre a prótese (75,9%) e a mucosa adjacente (72,4%). Zahir e Himratul-Aznita (2013) analisaram a distribuição de *Candida* na cavidade bucal, com coletas de diversos sítios como, língua, palato, mucosa bucal e saliva e verificaram maiores porcentagens na superfície do palato de usuários de próteses. Esta diferença nos resultados pode ser explicada em função das metodologias distintas de coleta das amostras, a qual pode ser realizada por meio de coleta mecânica (escovação; esfregaço), enxaguado (bochecho ou coleta de saliva), cultura de impressão e biópsia (Williams; Lewis, 2000; Byadarahally Raju; Rajappa, 2011). A coleta mecânica utilizando escova tem como vantagem o isolamento das espécies de um sítio específico enquanto os demais métodos coletam micro-organismos da boca toda.

A seleção do método de identificação das espécies de *Candida* utilizado baseou-se na literatura, que considera o uso do meio CHROMagar *Candida* como um método fácil e eficiente na identificação presuntiva de *Candida* spp. podendo ser indicado em

situações de inviabilidade da aplicação do método molecular por PCR (reação em cadeia da polimerase; *Polymerase Chain Reaction*) (Madhavan et al., 2011; Sahiner et al., 2011; Daef et al. 2014). Com relação à incidência das diferentes espécies de *Candida*, a maior porcentagem encontrada foi de *C. albicans* (54,5%), seguida de *C. tropicalis* (22%), *C. glabrata* (16%) e *C. krusei* (1,5%). Estes achados corroboram com Mima et al. (2012), Sanitá et al. (2014), Tay et al. (2014) e Salles et al. (2015a), estudos que também realizaram identificação presuntiva e constataram maior incidência de *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Song et al. (2009) e Sánchez-Vargas et al. (2013), embora utilizando metodologia diferente para identificação, encontraram resultados semelhantes. Entretanto, existem estudos com resultados controversos. Vanden Abbeele et al. (2008) e Zomorodian et al. (2011) verificaram maior incidência de *C. glabrata* em detrimento de *C. tropicalis*. Daef et al. (2014) relataram maior quantidade de *C. tropicalis*, seguido de *C. albicans* e *C. glabrata*. Badaró et al. (2016b) encontraram maior incidência de *C. tropicalis*. Uma hipótese para explicar estes diferentes resultados pode ser a diferença entre as localidades de realização dos estudos, características das amostras recrutadas e/ou sítios de coleta utilizados, bem como a metodologia empregada. Portanto, estudos que avaliem diferentes metodologias e que façam a correlação dos resultados ainda precisam ser realizados, embora, deve ser considerado que, independentemente da ordem, todos os estudos citados isolaram em maior quantidade, as mesmas três espécies, sendo relevante clinicamente.

Tendo em vista a coincidente presença de *Candida* spp. na mucosa palatal, aparelhos protéticos e diferentes sítios de coleta, como urina, aspirados endotraqueais, escarro e sangue (Daef et al., 2014), pode-se afirmar que estes micro-organismos possuem capacidade de colonizar e se adaptar a diversos locais no corpo humano. Assim, destaca-se a importância da higienização da cavidade bucal e dos aparelhos protéticos como complemento à prevenção de infecções e garantia de saúde do indivíduo.

A elevada incidência de infecções por *Candida* e o desenvolvimento de resistência aos fármacos (Cataldi et al., 2016) com consequente recorrência dos sinais clínicos das infecções devido à recolonização por *Candida* spp. (Gendreau; Loewy, 2011; Sanitá et al., 2012) justificam a necessidade do conhecimento da prevalência e dos padrões de susceptibilidade das diferentes espécies de *Candida* para instituição de um adequado controle de infecções, composto por procedimentos de higienização associados ou não ao tratamento com antifúngico. De acordo com Bandara et al. (2016),

as terapias alternativas ou adjuntas são necessárias para controlar as infecções por *Candida*, uma vez que o número reduzido de fármacos antifúngicos atualmente disponíveis está comprometido devido à sua toxicidade sistêmica, reatividade cruzada com outras drogas e, sobretudo, pelo surgimento de espécies de *Candida* resistentes aos fármacos devido ao uso irracional dessas drogas. Assim, este trabalho buscou um maior enfoque preventivo por meio do estudo de uma alternativa viável à administração de antifúngicos de maneira corriqueira, preservando sua utilização somente para casos específicos e de maior gravidade. Para isso, foram considerados estudos presentes na literatura, que buscam estabelecer um protocolo de higienização eficaz na remoção de biofilme dos aparelhos protéticos e prevenção ou remissão de estomatite relacionada à prótese (Paranhos et al., 2007; Andrade et al., 2014; Segundo et al., 2014; Arruda et al., 2016; Badaró et al., 2016b). Somado a isto, as variáveis deste estudo objetivaram obter respostas que possam contribuir para consolidação destes protocolos de higienização, sendo inclusive, eficientes no controle de *Candida* spp., extremamente necessário para pacientes diagnosticados com estomatite relacionada à prótese.

A associação do método mecânico com as soluções desinfetantes neste trabalho demonstrou superioridade do Hipoclorito de sódio a 0,25% na redução da incidência de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* tanto nas próteses, quanto no palato dos participantes, corroborando com os resultados de eficácia desta concentração do Hipoclorito junto as análises antimicrobianas de Salles et al. (2015a e 2015b). A Cloramina T a 0,5% promoveu redução dos isolados de *Candida* somente para as próteses totais, enquanto que a solução de *R. communis* a 10% causou diminuição somente na incidência de *C. tropicalis* em ambos os sítios de coleta. Estes resultados são relevantes porque indicam que o tratamento com Hipoclorito de sódio e *R. communis* afetou, indiretamente, a colonização da mucosa, mostrando a importância da seleção de um método que tenha ação ampla. Na literatura não há estudos que mostrem esta relação.

Em associação à incidência, foi verificado o efeito das soluções desinfetantes sobre a capacidade de crescimento de *Candida* spp., pela contagem de UFC, que demonstrou ser solução X tempo dependente para as amostras coletadas da prótese.

Considerando o fator tempo, somente o Hipoclorito de sódio e a Cloramina T promoveram redução do crescimento de colônias após 07 dias, mantendo este resultado em 37 dias. O *Ricinus communis* não foi capaz de influenciar a contagem de UFC em comparação ao *Baseline*, bem como o grupo controle (salina). Comparando as soluções,

o Hipoclorito de sódio a 0,25% foi a mais eficiente, uma vez que inibiu o crescimento de UFC após 07 e 37 dias de utilização. Estes resultados estão de acordo com a literatura que evidencia a efetividade da solução de Hipoclorito de sódio a 0,25% (Salles et al., 2015a e 2015b; Badaró et al., 2016b) e a 0,2% (Arruda et al., 2016), devido ação direta sobre a matriz orgânica do biofilme, que provoca a dissolução por oxidação dos componentes protéicos, ou mesmo a redução da capacidade de adesão de *Candida* spp. (Nikawa et al., 1999; Barnabé et al., 2004; Paranhos et al., 2009).

Como visto, ao longo do período experimental, a Cloramina T a 0,5% causou redução significativa na contagem de UFC se comparada ao *Baseline*, porém nas avaliações após 07 e 37 dias os resultados foram semelhantes ao grupo controle (Salina). Avaliações com diferentes concentrações e tempo de imersão são necessárias devido à escassez de estudos na literatura e seu potencial de uso como agente higienizador, uma vez que resultados satisfatórios foram obtidos no controle de biofilme empregando antisséptico bucal (Pitten; Kramer, 1999) e dentifrícios (Panzeri et al., 2009; Tirapelli et al., 2010, de Andrade et al., 2012) contendo Cloramina T na formulação. A Cloramina T possui ação biocida por meio de reações oxidativas e de hidrólise proteica, destruindo o material celular dos micro-organismos. Apresenta efetividade tanto em ambiente aeróbio como anaeróbio, mesmo em baixas concentrações (Akzo Nobel Boletim Técnico, 1995).

Quanto a solução de *R. communis* a 10%, os resultados foram semelhantes ao grupo controle, bem como ao *Baseline*, após 07 e 37 dias. Estes resultados estão de acordo com Arruda et al. (2016) que utilizaram o *R. communis* a 8% e verificaram igualdade estatística desta solução com o Controle e *Baseline*. Porém, Salles et al. (2015b) encontrou ação antimicrobiana da solução de *R. communis* a 10% intermediária ao Hipoclorito de sódio a 0,25% e grupo Controle. Resultados não satisfatórios envolvendo a ação antimicrobiana do *R. communis* na desinfecção de próteses totais contrastam com achados referentes à sua efetividade na remissão da estomatite relacionada à prótese (Pinelli et al., 2013; Arruda et al., 2016; Badaró et al., 2016b). Portanto, há necessidade do desenvolvimento de novos trabalhos para conhecimento do mecanismo de ação e concentração mais indicada para uso da solução de *R. communis*.

Considerando as coletas do palato, o uso das soluções desinfetantes nas próteses totais ou os períodos de tempo analisados associado à escovação do palato pelos participantes, não provocaram alterações significativas na contagem de UFC de *Candida* spp., embora tenham influenciado a incidência destes micro-organismos.

Kabawat et al. (2014) avaliaram o efeito da escovação do palato de indivíduos desdentados usuários de prótese total sobre a contagem de UFC após 30 e 90 dias e verificaram que houve redução de UFC após o período prolongado da intervenção. É possível inferir que o tratamento da prótese associado à escovação do palato em um curto período de tempo não contribui para redução do crescimento microbiano na mucosa e que novos estudos com períodos de tempo prolongados poderiam ser realizados. Segundo Emami et al. (2007) existe uma relação inversamente proporcional entre a escovação do palato e a presença de *C. albicans*, embora os autores não tenham encontrado associação estatisticamente significativa entre hábitos de higiene e presença de estomatite relacionada à prótese. Uma limitação do presente estudo foi a não avaliação da inflamação do palato ao longo do período experimental, uma vez que estes dados poderiam contribuir para relacionar o efeito do uso das soluções na prótese e inflamação, já que as próteses são consideradas reservatórios para os micro-organismos e Badaró et al. (2016b) encontraram relação entre instituição de protocolo de higiene para prótese e redução de estomatite.

5.2 ESTUDO IN VITRO

O estudo in vitro teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana das soluções desinfetantes por meio de diferentes variáveis de resposta, controlando os fatores de variação inerentes aos estudos clínicos, tais como dedicação dos indivíduos aos procedimentos recomendados, hábitos alimentares, condições físicas e sociais.

Ao reunir as variáveis propostas, nota-se que foram utilizados três métodos distintos para verificar a viabilidade celular de *Candida* spp., sendo que cada um contribuiu com informações complementares de elevada importância. A contagem de UFC permitiu verificar o potencial de crescimento das espécies de *Candida* após contato com as soluções desinfetantes, enquanto a análise pelo XTT indicou o metabolismo celular das células, possibilitando colher informações se a célula de *Candida* após os procedimentos de higiene teria condições suficientes de crescimento ou se foi alcançado um limiar que a inibiria. Por último, por meio da quantificação de células vivas por microscopia de epifluorescência pode-se verificar a ação direta das soluções sobre o biofilme formado nos corpos de prova. Portanto, para um amplo e adequado conhecimento da ação das soluções desinfetantes estudadas, a reunião das variáveis que analisaram a viabilidade de *C. albicans* e *Candida non-albicans* foram

necessárias, evidenciando inclusive, a necessidade de estudos envolvendo *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

A primeira variável indicou, assim como no estudo clínico que o Hipoclorito de sódio a 0,25% foi a solução mais efetiva contra o crescimento de colônias de todas as espécies de *Candida* quando comparada às demais, corroborando com Salles et al. (2015b). A solução de *R. communis* reduziu o número de contagem de UFC somente de *C. glabrata* e apresentou eficácia inferior às demais. Estes resultados estão de acordo com Arruda et al. (2016). Entretanto, esperava-se observar redução significativa na contagem de UFC após imersão dos espécimes na solução de *R. communis* uma vez que a literatura aponta resultados favoráveis em relação a ela (Segundo et al. 2014; Salles et al., 2015a e 2015b). Ainda, Leite et al. (2014) verificaram que a concentração inibitória mínima do *R. communis* foi de 0,0781% para *C. albicans* e *C. glabrata*, concentração inferior à avaliada neste estudo e que incorporada a um dentifrício apresentou ação significativa contra bactérias como *S. mutans* e *B. subtilis*, micro-organismos importantes na formação do biofilme. Esta variação nas repostas aos protocolos de higiene pode ser atribuída às diferentes espécies de micro-organismos usados nos estudos e que podem apresentar diferenças na suscetibilidade ao agente antimicrobiano. Segundo Takano et al. (2007) a ação detergente do *R. communis* causa danos à parede celular de fungos com consequente perda de constituintes do citoplasma e morte celular. Estudos que avaliem a utilização da solução de *R. communis* em períodos de imersão prolongado (overnight) e até mesmo contra biofilmes mistos poderia apresentar resultados diferentes. Por fim, a solução de Cloramina T a 0,5% causou redução significativa do número de UFC para todas as espécies de *Candida* quando comparada ao *R. communis* e grupo Controle, sendo inferior apenas ao Hipoclorito de sódio. Resultado favorável empregando Cloramina T em solução de imersão também foi encontrado contra biofilme bacteriano colonizando materiais de implante dentário (Verardi et al., 2016) e como composto de dentifrício para próteses totais contra *C. albicans* e *C. glabrata* (Leite, 2015).

Com relação ao metabolismo celular de *Candida* spp. após exposição às soluções desinfetantes, os resultados encontrados foram correspondentes aos obtidos para o crescimento de colônia em meio de cultura. A solução de Hipoclorito de sódio à 0,25% diminuiu a atividade metabólica de todas as espécies de *Candida* em 100%. Resultados aproximados foram apresentados por Panariello et al. (2016), uma vez que o Hipoclorito de sódio a 1%, em imersões de 10 segundos, reduziu a zero a contagem de

UFC de *C. albicans* e *C. glabrata* e diminuiu o metabolismo celular em 98% em um modelo de biofilme misto composto por *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. A diferença principal entre os dois estudos foi o modelo de biofilme que pode ter atribuído maior resistência aos micro-organismos e/ou tempo de imersão reduzido (10 segundos). Pellizzaro et al. (2012) verificaram que a imersão em Hipoclorito de sódio a 1% de espécimes contaminados por *C. albicans* promoveu uma redução do metabolismo do biofilme em apenas 88%. Por se tratar de um experimento com biofilme simples pode-se inferir que este resultado foi influenciado pelo reduzido tempo de contato com a solução desinfetante (90 segundos) e a não padronização da rugosidade dos espécimes, que possibilitou maior adesão e organização do biofilme formado e consequente dificuldade de ação da solução.

As soluções de *R. communis* e Cloramina T causaram diminuição significativa da atividade metabólica de todas as espécies de *Candida*, quando comparadas ao controle. O *R. communis* apresentou melhores resultados para esta variável se comparada à redução de UFC, uma vez que foi eficiente somente contra *C. glabrata*. Isto demonstra que mesmo que o *R. communis* tenha reduzido o metabolismo das três espécies de *Candida* analisadas, somente para *C. glabrata* atingiu-se um nível suficiente para influenciar no crescimento de unidades formadoras de colônias. Para *C. albicans*, a solução de *R. communis* apresentou efetividade estatisticamente igual à da solução de Cloramina T quanto a redução do metabolismo celular, entretanto, na contagem de UFC, somente a Cloramina T exerceu influência para que houvesse redução no crescimento do micro-organismo. Já para a *C. tropicalis*, o *R. communis* causou alterações significativas que a diferiram do controle, porém foram menos eficazes na redução do metabolismo celular que a Cloramina T, o que no crescimento de UFC, não foi suficiente para provocar reduções. Dessa forma, comparando ambas as soluções desinfetantes e variáveis in vitro, somente a Cloramina T a 0,5% apresentou correspondência quanto à redução do metabolismo celular e diminuição na contagem de UFC das espécies de *Candida* analisadas. Estudos com as soluções desinfetantes utilizadas nesta pesquisa com igual concentração são escassos limitando as informações quanto a esta variável e fatores de variação empregados.

A terceira variável analisada foi a produção de enzimas hidrolíticas após exposição das *Candida* spp. nas soluções desinfetantes. Dentre os importantes e conhecidos fatores de virulência das espécies de *Candida* encontram-se a produção das enzimas proteinase e fosfolipase. Estas enzimas desempenham papel importante na

nutrição, adesão às células do hospedeiro e destruição dos tecidos resultando na disseminação do patógeno. A atividade da proteinase é complementada pela ação de fosfolipases, que são enzimas responsáveis pela hidrólise de uma ou mais ligações glicerofosfolipídicas da membrana celular (Budzynska et al., 2014). Os resultados mostraram que as soluções não interferiram na produção de proteinase e fosfolipase, embora tivessem causado alterações no metabolismo celular ou crescimento microbiano, com exceção da *C. glabrata*, em que todas as soluções desinfetantes provocaram aumento da produção de proteinase. Budzynska et al. (2014) demonstraram que a atividade enzimática de *Candida albicans* tratada com óleos essenciais em baixas concentrações foi significativamente diminuída. Gümrü et al. (2006), analisaram a produção de fosfolipase por *Candida* spp. e não obtiveram resultados perceptíveis de produção de enzima pelas espécies non-*albicans*, somente para *C. albicans*, semelhantemente ao ocorrido com Marcos-Arias et al. (2009), o que concorda em partes com este estudo, o qual verificou a não alteração de enzimas para nenhuma das espécies analisadas.

Ao contrário do que se espera, ou seja, redução da produção de enzimas em função do efeito antimicrobiano das soluções, e em especial do Hipoclorito de sódio que foi uma solução 100% eficiente na inibição do crescimento microbiano e atividade metabólica das espécies de *Candida* avaliadas, a *C. glabrata* teve a produção de proteinase aumentada quando em contato com as soluções desinfetantes. Isto sugere uma maior capacidade específica do micro-organismo em reagir a um dado estímulo (D'Eça Júnior et al., 2011), uma vez que um fator que pode influenciar a sobrevivência ou persistência de fungos entre a exposição inicial a um agente antimicótico e a aquisição de mutações que conferem resistência é a resposta adaptativa. Após exposição a tensões ambientais, tais como alterações de temperatura, iônica, oxidativa e osmolaridade, e/ou pressão de fármaco, os fungos ativam respostas de stress para minimizar os efeitos nocivos e evitar a morte. *C. glabrata* tem uma estrutura populacional complexa, onde variantes genômicas podem surgir durante o processo de adaptação às mudanças ambientais, e persistirem ao longo do tempo, conferindo a esta espécie maior patogenicidade (Healey et al., 2016). Uma limitação para este ensaio foi a utilização das células retiradas do meio Letheen (sobrenadante), o qual apresenta cor e portanto, fluorescência. Como forma de minimizar este efeito e com a restrição imposta pela necessidade de neutralização de qualquer resíduo das soluções desinfetantes para o adequado prosseguimento da análise, o meio Letheen foi empregado não somente para

todas as amostras, mas também na confecção da curva padrão em $\mu\text{g/mL}$. Este procedimento atribuiu uma mesma condição para todo o experimento, mantendo os resultados esperados dentro da preconização contida no protocolo do fabricante. A curva padrão foi composta por cinco pontos crescentes de diluição, os quais mantiveram os valores de fluorescência compatíveis com o esperado. Em outras palavras, houve a formação de uma curva linear como o método exige para realização da equação da reta, útil na transformação dos valores de fluorescência para $\mu\text{g/mL}$. A formação adequada da curva padrão confirmou a viabilidade da análise da produção de proteinase das *Candida* spp..

A presença de hifas é importante para formação (Nett; Andes, 2006) e aumento na massa do biofilme de *Candida* com consequente aumento na dificuldade de remoção (Jackson et al., 2014). No presente estudo, foram avaliadas somente *C. albicans* e *C. tropicalis* porque *C. glabrata* não forma hifas. No entanto, esta espécie depende da presença de hifas de *C. albicans* para conseguir se aderir e causar infecção em casos de Candidíase orofaríngea, demonstrando a possibilidade de sinergismo entre espécies (Tati et al., 2016). O Hipoclorito de sódio a 0,25% impediu a formação de hifas, resultado coerente aos encontrados para as demais variáveis. A solução de Hipoclorito de sódio a 0,25% apresentou impacto negativo na patogenicidade das espécies de *Candida* avaliadas uma vez que inibiu o crescimento microbiano, a atividade metabólica e a formação de hifas. A solução de Cloramina T a 0,5% apresentou valores do intervalo de confiança consideravelmente menores que o *R. communis* a 10%, contudo, foram estatisticamente semelhantes entre si e o grupo controle, o que significa que não inibiram a transformação das células leveduriformes para hifas. As soluções desinfetantes devem apresentar capacidade de inibir a formação de hifas, conseguindo indiretamente propiciar um maior controle de infecções.

Segundo Staniszewska et al. (2012) há uma relação entre o dimorfismo de cepas de *C. albicans* e a produção de proteinases. Os autores verificaram que na forma de blastoconídios a quantidade de enzimas produzidas foi reduzida se comparada às situações onde houve formação do tubo germinativo, pseudohifas e hifas verdadeiras. Naglik et al. (2003) afirmaram que a formação de hifas e a produção de proteinases são reguladas de forma coordenada, uma vez que as células em forma de hifas de *C. albicans* requerem o suporte de enzimas hidrolíticas para serem totalmente invasivas in vivo. Dessa forma, a não significância na produção de proteinase das cepas de *C. albicans* deste estudo pode ser explicada em decorrência da não formação de hifas,

diferentemente da *C. glabrata*, que não forma hifas e apresentou produção de proteinase após contato com as soluções desinfetantes. Deve-se ressaltar que, neste estudo, os ensaios realizados para estas variáveis foram efetuados concomitantemente, reforçando esta hipótese.

A quinta e última variável *in vitro* avaliou a capacidade de remoção do biofilme pelas soluções desinfetantes e como complemento, quantificou o número de células vivas por meio de microscopia de epifluorescência. A imersão dos espécimes em Hipoclorito de sódio a 0,25% reduziu a zero (0) a quantidade de células vivas e esta solução causou a maior remoção de biofilme das superfícies analisadas. Este achado é importante uma vez que a manutenção de células mortas sobre a superfície da prótese funciona como agente de agregação para adesão de novas células. Os piores resultados foram encontrados no grupo controle (água) para todas as espécies de *Candida* analisadas.

Da Silva et al. (2011) avaliaram a presença de células vivas e capacidade de remoção do biofilme de *C. albicans* após imersão em Hipoclorito de sódio a 1% e 2% (5 minutos) e obtiveram resultados similares a este estudo, com redução total de células vivas e maior redução de biofilme proporcionalmente a concentração da solução empregada. Gama et al. (2015) utilizaram o Hipoclorito de sódio a 2% como controle negativo (imersão por 10 minutos) e verificaram maior eficácia que as soluções experimentais testadas para remoção do biofilme e presença de células vivas sobre a resina acrílica termopolimerizável. É importante destacar que os autores preconizaram o tempo de imersão de 5 e 10 minutos, enquanto o presente estudo indicou 20 minutos, o que demonstra que o uso do Hipoclorito de sódio em menores concentrações consegue alcançar a eficácia ao permanecer em contato com o biofilme por um tempo de exposição maior. Isto possibilita a redução de alterações nas propriedades físico mecânicas dos materiais constituintes das próteses totais, em especial a rugosidade. Badaró et al. (2016a) verificaram que, após imersão da resina acrílica termopolimerizável polida em Hipoclorito de sódio a 0,25%, os valores de rugosidade se mantiveram clinicamente aceitáveis, os quais quando aumentados propiciam maior adesão de micro-organismos (Karakis et al., 2016). Ainda, Bueno (2016) avaliou o efeito das mesmas soluções avaliadas neste estudo (Hipoclorito de sódio a 0,25%; *R. communis* a 10%; Cloramina T a 0,5%) e tempo (20 minutos) sobre as propriedades físico mecânicas dos materiais constituintes de próteses totais e obteve resultados clinicamente aceitáveis para diferentes variáveis, exceto alteração de cor.

As soluções de Cloramina T a 0,5% e *R. communis* a 10% causaram redução na porcentagem de células vivas de todas as espécies de *Candida* quando comparadas à água. A Cloramina T obteve melhores resultados para *C. albicans* e *C. tropicalis*. Contudo, houve igualdade de resultados para *C. glabrata*, semelhantemente ao ocorrido para variável envolvendo o metabolismo celular e contrastando com os resultados de contagem de UFC, no qual a Cloramina T foi superior. A análise conjunta desses achados permitem inferir que após exposição ao *R. communis* as cepas de *C. glabrata* apresentaram maior potencial de recuperação para promover o crescimento de UFC do que aquelas imersas em Cloramina T. Quanto à remoção do biofilme, o *R. communis* reduziu de forma significativa a quantidade de todas as espécies analisadas quando comparado à água. A Cloramina T foi mais eficiente que o *R. communis* para remoção do biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis* e menos eficiente para remoção de biofilme de *C. glabrata*.

Os resultados encontrados para o Hipoclorito de sódio no presente estudo estão de acordo com a literatura (Andrade et al., 2014; Arruda et al., 2016; Badaró et al., 2016b) que indica que a imersão nesta solução é mais eficiente na capacidade de remoção do biofilme de próteses totais e que o *R. communis* apresenta ação intermediária (Andrade et al., 2014; Badaró et al., 2016b), com resultados significativamente diferentes do grupo controle (água) e inferiores ao Hipoclorito de sódio. No entanto, este estudo diferiu de Arruda et al. (2016), em que o *R. communis* apresentou igualdade estatística com o controle.

Com relação à Cloramina T, poucos são os estudos que avaliaram este agente em forma de solução de imersão contra biofilme de próteses totais o que torna difícil a comparação dos resultados. Apenas um estudo foi encontrado utilizando a solução como agente de desinfecção para implantes dentários (Verardi et al., 2016), o qual verificou redução no número de UFC quando comparado ao controle. O princípio ativo foi empregado na formulação de dentifrício (de Andrade et al., 2012; Leite, 2015) para próteses totais e verificaram sua eficácia na remoção do biofilme, concordando com este trabalho quanto a viabilidade de uso da Cloramina T para esta variável.

As limitações desta pesquisa referem-se ao não acompanhamento clínico da melhora da inflamação por estomatite relacionada à prótese, bem como a não confirmação molecular das identificações de *Candida* spp. coletadas das próteses totais e mucosa palatal. Para o estudo in vitro, pode-se citar como limitação a não avaliação

das variáveis utilizando biofilme misto, considerando a interação entre os micro-organismos.

Cabe destacar que este estudo avaliou o efeito das diferentes soluções contra *C. tropicalis*, e não há, na literatura, estudos que realizaram igual análise, o que demonstra necessidade de maior abordagem quanto a esta espécie de *Candida*, uma vez que é um agente comum de Candidemia em hospitais brasileiros, sendo a segunda espécie mais frequente, observada principalmente em adultos e idosos, sendo semelhante epidemiologicamente em outras partes do mundo (Nucci; Colombo, 2007). Sánchez-Vargas et al. (2013) quantificaram biofilme de isolados clínicos de *Candida* spp. por meio do ensaio de XTT e demonstraram que a formação de biofilme é dependente das espécies de *Candida* e que, embora *C. albicans* seja a espécie mais incidente, a produção de biofilme foi maior nos isolados de *C. glabrata*, seguida por *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. krusei*. Esses achados reforçam a importância de pesquisas, como este estudo, envolvendo espécies menos incidentes, mas que possuem elevado potencial de virulência.

6. Conclusões

Com base nas condições experimentais e desfechos obtidos, pode-se concluir que:

ESTUDO IN VIVO

- As espécies de *Candida* mais incidentes na superfície interna de próteses totais e fibromucosa do palato foram *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.
- A solução de Hipoclorito de sódio a 0,25% causou redução na incidência de *Candida* spp. e maior eficácia contra o crescimento microbiano, após 7 e 37 dias;
- A solução de Cloramina T a 0,5% demonstrou redução na incidência de *Candida* spp. nas próteses totais e eficiência intermediária quanto à redução na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), após 7 e 37 dias;
- A solução de *Ricinus communis* a 10% reduziu a incidência de *C. tropicalis* em ambos os sítios de coleta, porém não apresentou atividade inibitória do crescimento de *Candida* spp., sendo semelhante ao Cloreto de sódio a 0,85% (salina – controle).

ESTUDO IN VITRO

- A solução de Hipoclorito de sódio a 0,25% apresentou a maior efetividade e a Cloramina T a 0,5% apresentou resultados intermediários quanto à redução do crescimento microbiano, metabolismo celular e manutenção de células vivas;
- A solução de *Ricinus communis* a 10% apresentou resultados intermediários para o crescimento microbiano apenas contra *C. glabrata*, assim como redução do metabolismo celular e manutenção de células vivas de *Candida* spp.;
- A solução de Hipoclorito de sódio a 0,25% foi à solução desinfetante mais eficiente contra a formação de hifas;

- A produção de enzimas proteolíticas pelas espécies de *Candida* spp. não sofreu alteração após contato com as soluções desinfetantes, com exceção da produção de proteinase pela *C. glabrata*, em que houve igualdade entre os agentes desinfetantes;
- O Hipoclorito de sódio a 0,25% promoveu a maior remoção de biofilme da superfície da resina acrílica termopolimerizável, independentemente da espécie de *Candida*; Cloramina T a 0,5% e *Ricinus communis* a 10% demonstraram resultados intermediários.

Há viabilidade do uso da solução de Hipoclorito de sódio a 0,25% para imersão de próteses totais para controle de *Candida* spp. e seus respectivos fatores de virulência. A Cloramina T a 0,5% apresentou resultados que favorecem o desenvolvimento de novos produtos específicos para aparelhos protéticos. A solução de *Ricinus communis* a 10% não apresentou resultados satisfatórios para controle dos fatores de virulência de *Candida* spp..

ESTA TESE FOI REALIZADA COM O APOIO DO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO – CNPq (PROCESSO Nº 142219/2015-0).

Referências Bibliográficas¹

¹ De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors, adaptado pela U.S. National Library of Medicine (estilo Vancouver).

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>

1. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. incidence in denture wearers. *Mycopathologia*. 2010 May;169(5):365-72.
2. Akzo nobel boletim technical: Halamid the universal disinfectant, 1995.
3. Al-Saadi MH. Effectiveness of chemical and microwave disinfection on denture biofilm fungi and the influence of disinfection on denture base adaptation. *J Indian Prosthodont Soc*. 2014 Dec;14(Suppl 1):24-30.
4. Altieri KT, Sanita PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, et al. Eradication of a mature methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. *Braz Dent J*. 2013 Sep-Oct;24(5):487-91.
5. Ambjornsen E, Rise J, Haugejorden O. A study of examiner errors associated with measurement of denture plaque. *Acta Odontol Scand*. 1984 Jun;42(3):183-91.
6. American Dental Association – ADA. Denture base polymers. Specification nº 12. Chicago: Council on Scientific Affairs; 1975.
7. 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 Jan-Feb;25(1):43-7.
8. Arnitz R, Nagl M, Gottardi W. Microbicidal activity of monochloramine and chloramine T compared. *J Hosp Infect*. 2009 Oct;73(2):164-70.
9. Arruda CN, Salles MM, Badaro MM, de Cassia Oliveira V, Macedo AP, Silva-Lovato CH, et al. Effect of sodium hypochlorite and *Ricinus communis* solutions on control of denture biofilm: A randomized crossover clinical trial. *J Prosthet Dent*. 2016 Dec 04. No prelo.
10. Badaró MM, Salles MM, de Arruda CN, Oliveira VC, de Souza RF, Paranhos HF, et al. In vitro analysis of surface roughness of acrylic resin exposed to the combined hygiene method of brushing and immersion in *Ricinus communis* and sodium hypochlorite. *J Prosthodont*. 2016a Feb 02. No prelo.
11. Badaró MM, Salles MM, Leite VMF, Arruda CNF, Oliveira VC, Nascimento C, Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. Clinical trial for evaluation of *Ricinus communis* and sodium hypochlorite as denture cleanser. *J Appl Oral Sci*. 2016b. No prelo
12. 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

[dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2013.

13. Bandara HM, Matsubara VH, Samaranayake LP. Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 Dec 16.:1-20. No prelo
14. Barnabe W, de Mendonca Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*. 2004 May;31(5):453-9.
15. Brasil. Lei nº. 10.973, de 2 de Dezembro de 2004. Poder Legislativo. Diário Oficial da União - Seção 1 - 3/12/2004, Página 2 (Publicação Original).
16. Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SBBrasil 2010. Pesquisa nacional de saúde bucal: resultados principais. Brasília, DF: Secretária de Atenção a Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação de Saúde Bucal, 2011. 92p.
17. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974;82(2):151-90.
18. Budzynska A, Sadowska B, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska B. Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oils. *Acta Biochim Pol*. 2014;61(1):115-21.
19. Bueno, FL. Avaliação dos efeitos adversos de soluções desinfetantes nas propriedades físicas e mecânicas de materiais para confecção de próteses totais [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2016.
20. Buergers R, Rosentritt M, Schneider-Brachert W, Behr M, Handel G, Hahnel S. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2008 Jun;66(3):174-80.
21. Byadarahally Raju S, Rajappa S. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *ISRN Dent*. 2011;2011:487921.
22. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001 Jul;9(7):327-35.
23. Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Carvalho TLL. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo de rato. *Pesq Odontol Bras*. 2001;15(3):257-62.

24. Carvalho TLL, Araújo CACA, Teófilo JM, Brentegani LG. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996;26(2):149-52.
25. Cataldi V, Di Campli E, Fazii P, Traini T, Cellini L, Di Giulio M. *Candida* species isolated from different body sites and their antifungal susceptibility pattern: Cross-analysis of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Med Mycol.* 2016 Dec 02. No prelo.
26. Coenye T, De Prijck K, Nailis H, Nelis HJ. Prevention of *Candida albicans* biofilm formation. *Open Mycology J.* 2011;5: 9-20.
27. Costa CR, Passos XS, e Souza LK, Lucena Pde A, Fernandes Ode F, Silva Mdo R. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010 May-Jun;52(3):139-43.
28. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci.* 2007;64(4):180-9.
29. Crincoli V, Scivetti M, Di Bisceglie MB, Pilolli GP, Favia G. Unusual case of adverse reaction in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment: a case report. *Quintessence Int.* 2008; 39(2):70-3.
30. da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses.* 2011 Nov;54(6):e712-7.
31. Daef E, Moharram A, Eldin SS, Elsherbiny N, Mohammed M. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Braz J Microbiol.* 2014;45(1):255-62.
32. Dandakis C, Lambrianidis T, Boura P. Immunologic evaluation of dental patient with history of hypersensitivity reaction to sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16(4):184-7.
33. Davi LR, Peracini A, Ribeiro Nde Q, Soares RB, da Silva CH, Paranhos Hde F, et al. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. *Gerodontology.* 2010 Dec;27(4):297-302.
34. de Andrade IM, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Pisani MX, de Andrade KM, Paranhos Hde F. Trial of experimental toothpastes regarding quality for cleaning dentures. *Int J Prosthodont.* 2012 Mar-Apr;25(2):157-9.

35. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabr M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol.* 2012 Oct;35(4):459-68.
36. De Rossi T, Lozovoy MAB, Da Silva RV, Fernandes EV, Geraldino TH, Costa IC et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. *Ciências Biológicas e da Saúde.* 2011;32(1):15-28.
37. D'Eça Junior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, de Maria Silva Figueiredo P, de Andrade Monteiro C. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 May-Jun;44(3):334-8.
38. Douglass CW, Shih A, Ostry L. Will there be a need for complete dentures in the United States in 2020?. *J Prosthet Dent.* 2002 Jan;87(1):5-8.
39. Duyck J, Vandamme K, Muller P, Teughels W. Overnight storage of removable dentures in alkaline peroxide-based tablets affects biofilm mass and composition. *J Dent.* 2013 Dec;41(12):1281-9.
40. Emami E, Seguin J, Rompre PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. *Int J Prosthodont.* 2007 Sep-Oct;20(5):514-20.
41. Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Am Dent Assoc.* 2011 Feb;142 Suppl 1:1S-20S.
42. Felton DA. Complete edentulism and comorbid diseases: An Update. *J Prosthodont.* 2016 Jan;25(1):5-20.
43. Fernandes FH, Orsi IA, Villabona CA. Effects of the peracetic acid and sodium hypochlorite on the colour stability and surface roughness of the denture base acrylic resins polymerised by microwave and water bath methods. *Gerodontology.* 2013 Mar;30(1):18-25.
44. Ferreira CM, Bonifácio KC, Fröner IC, Ito IY. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigation solutions in teeth with pulpal necrosis. *Braz Dent J.* 1999;10(1):15-21.
45. Ferreira CM, Rosa OPS, Torres SA, Ferreira FBA, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J.* 2002;13(2):118-22.

46. 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 Investig. 2009 Jun;13(2):237-42.
47. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010 Sep;8(9):623-33.
48. Gama MC, de Oliveira DG, da Silva PM, Ordinola-Zapata R, Duarte MH, Porto VC. Antifungal activity of 4% chlorhexidine and 2% sodium hypochlorite against *Candida albicans* biofilms. Gen Dent. 2015 Sep-Oct;63(5):43-7.
49. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont. 2011 Jun;20(4):251-60.
50. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 2000 Jan;13(1):122-43, table of contents.
51. Gumru B, Kadir T, Uygun-Can B, Ozbayrak S. Distribution and phospholipase activity of *Candida* species in different denture stomatitis types. Mycopathologia. 2006 Dec;162(6):389-94.
52. Ha KC, White TC. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Apr;43(4):763-8.
53. Haynes K. Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol. 2001 Dec;9(12):591-6.
54. Healey KR, Jimenez Ortigosa C, Shor E, Perlin DS. Genetic Drivers of Multidrug Resistance in *Candida glabrata*. Front Microbiol. 2016;7:1995.
55. Hilgert JB, Giordani JM, de Souza RF, Wendland EM, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the management of denture stomatitis: a systematic review and meta-analysis. J Am Geriatr Soc. 2016 Dec;64(12):2539-45.
56. Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Domann E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. Oral Microbiol Immunol. 2003 Oct;18(5):302-8.
57. Hostynek JJ, Wilhelm KP, Cua AB, Maibach HI. Irritation factors of sodium hypochlorite solutions in human skin. Contact Dermatitis. 1990 Nov;23(5):316-24.

58. Hua X, Yuan X, Mitchell BM, Lorenz MC, O'Day DM, Wilhelmus KR. Morphogenic and genetic differences between *Candida albicans* strains are associated with keratomycosis virulence. *Mol Vis*. 2009 Jul 30;15:1476-84.
59. Jackson S, Coulthwaite L, Loewy Z, Scallan A, Verran J. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J Prosthet Dent*. 2014 Oct;112(4):988-93.
60. Kabawat M, de Souza RF, Badaro MM, de Koninck L, Barbeau J, Rompre P, et al. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont*. 2014 Jul-Aug;27(4):311-9.
61. Karakis D, Akay C, Oncul B, Rad AY, Dogan A. Effectiveness of disinfectants on the adherence of *Candida albicans* to denture base resins with different surface textures. *J Oral Sci*. 2016;58(3):431-7.
62. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(2):211-24.
63. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe tooth loss: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2014 Jul;93(7 Suppl):20S-8S.
64. Keng SB, Lim M. Denture plaque distribution and the effectiveness of a perborate-containing denture cleanser. *Quintessence Int*. 1996 May;27(5):341-5.
65. Khater ES, Al-Nory MH. Exoenzymes activity and biofilm production in *Candida* species isolated from various clinical specimens in Benha University Hospital, Egypt. *British Microbiology Res J*. 2014;4(6):654-67.
66. Kuriyama T, Williams DW, Lewis MA. In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Dec;18(6):405-7.
67. Kurtulmus-Yilmaz S, Deniz ST. Evaluation of staining susceptibility of resin artificial teeth and stain removal efficacy of denture cleansers. *Acta Odontol Scand*. 2014 Nov;72(8):811-8.
68. Leite VM, Pinheiro JB, Pisani MX, Watanabe E, de Souza RF, Paranhos Hde F, et al. In vitro antimicrobial activity of an experimental dentifrice based on *Ricinus communis*. *Braz Dent J*. 2014;25(3):191-6.

69. Leite, VMF. Estudo in vitro e in vivo de dentifrícios experimentais à base de *Ricinus communis* (éster do ácido ricinoléico), Triclosan e Cloramina-T para higiene de próteses totais [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2015.
70. Loster BW, Loster J, Wieczorek A, Ryniewicz W. Mycological analysis of the oral cavity of patients using acrylic removable dentures. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:951572.
71. Lyon JP, de Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Nov;102(5):632-8.
72. Madhavan P, Jamal F, Chong PP, Ng KP. Identification of local clinical *Candida* isolates using CHROMagar *Candida* as a primary identification method for various *Candida* species. *Trop Biomed*. 2011 Aug;28(2):269-74.
73. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol*. 2009 Feb;54(2):127-31.
74. Marra J, Paleari AG, Rodriguez LS, Leite AR, Pero AC, Compagnoni MA. Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. *J Appl Oral Sci*. 2012 Nov-Dec;20(6):643-8.
75. Meneghin MP, Nomelini SM, Sousa-Neto MD, Marchesan MA, Franca SC, dos Santos HS. Morphologic and morphometric analysis of the root canal apical third cleaning after biomechanical preparation using 3.3% *Ricinus communis* detergent and 1% NaOCl as irrigating solutions. *J Appl Oral Sci*. 2006 Jun;14(3):178-82.
76. Miceli MH, Diaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*. 2011 Feb;11(2):142-51.
77. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Oct;18(10):E380-8.
78. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat*. 2004 Aug-Oct;7(4-5):301-9.
79. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Sep;67(3):400-28.

80. Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* 2011;13(12-13):963-76.
81. Nailis H, Kucharikova S, Ricicova M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol.* 2010;10:114.
82. Nasution AI. Virulence fator and pathogenicity of *Candida albicans* in oral candidiasis. *World journal of dentistry.* 2013;4(4):267-71.
83. Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Aug;9(4):340-5.
84. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent.* 1998 May;26(4):299-304.
85. 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 Mar-Apr;12(2):153-9.
86. Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 May;58(1):77-82.
87. Oliveira SA, Zambrana JR, Iorio FB, Pereira CA, Jorge AO. The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms. *Braz Oral Res.* 2014;28:22-7.
88. Orsi IA, Junior AG, Villabona CA, Fernandes FH, Ito IY. Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerised acrylic resin. *Gerodontology.* 2011 Dec;28(4):253-7.
89. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. *Am J Dent.* 2016 Jun;29(3):154-60.
90. Panzeri H, Lara EH, Paranhos Hde F, Lovato da Silva CH, de Souza RF, de Souza Gugelmin MC, et al. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. *Gerodontology.* 2009 Mar;26(1):26-33.

91. Paranhos Hde F, Davi LR, Peracini A, Soares RB, Lovato CH, Souza RF. Comparison of physical and mechanical properties of microwave-polymerized acrylic resin after disinfection in sodium hypochlorite solutions. *Braz Dent J.* 2009;20(4):331-5.
92. Paranhos Hde F, Salles AE, Macedo LD, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Watanabe E. Complete denture biofilm after brushing with specific denture paste, neutral soap and artificial saliva. *Braz Dent J.* 2013;24(1):47-52.
93. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2007 Aug;34(8):606-12.
94. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanita PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J.* 2012;23(5):547-54.
95. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1366-77.
96. Pinelli LA, Montandon AA, Corbi SC, Moraes TA, Fais LM. *Ricinus communis* treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. *J Oral Rehabil.* 2013 May;40(5):375-80.
97. Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont.* 2010a Jul;19(5):369-73.
98. Pisani MX, da Silva CH, Paranhos HF, Souza RF, Macedo AP. Evaluation of experimental cleanser solution of *Ricinus communis*: effect on soft denture liner properties. *Gerodontology.* 2012a Jun;29(2):e179-85.
99. Pisani MX, Lovato-Silva CH, Paranhos HFO, Souza RF, Macedo AP. The Effect of experimental denture cleanser solution *Ricinus communis* on acrylic resin properties. *Materials Research.* 2010b;13(3):369-73.
100. Pisani MX, Macedo AP, Paranhos Hde F, Silva CH. Effect of experimental *Ricinus communis* solution for denture cleaning on the properties of acrylic resin teeth. *Braz Dent J.* 2012b;23(1):15-21.
101. Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol.* 1999 Apr;55(2):95-100.

102. Przybylowska D, Mierzwinska-Nastalska E, Rubinsztajn R, Chazan R, Rolski D, Swoboda-Kopec E. Influence of denture plaque biofilm on oral mucosal membrane in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Adv Exp Med Biol*. 2015;839:25-30.
103. Quirce S, Barranco P. Cleaning agents and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(7):542-50; quiz 2p following 50.
104. Rodriguez Acosta EJ, da Silva PM, Jacobina M, Lara VS, Neppelenbroek KH, Porto VC. *Candida albicans* adherence to denture base material: chemical disinfection and the effect of acquired salivary pellicle formation. *J Prosthodont*. 2015 Apr;24(3):200-6.
105. Rossato MB, Unfer B, May LG, Braun KO. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. *Oral Health Prev Dent*. 2011;9(3):221-7.
106. Sahiner F, Ergunay K, Ozyurt M, Ardic N, Hosbul T, Haznedaroglu T. [Phenotypic and genotypic identification of *Candida* strains isolated as nosocomial pathogens]. *Mikrobiyol Bul*. 2011 Jul;45(3):478-88.
107. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 01;16(2):e139-43.
108. Salles MM, Badaro MM, Arruda CN, Leite VM, Silva CH, Watanabe E, et al. Antimicrobial activity of complete denture cleanser solutions based on sodium hypochlorite and *Ricinus communis* - a randomized clinical study. *J Appl Oral Sci*. 2015a Nov-Dec;23(6):637-42.
109. Salles MM, Oliveira Vde C, Souza RF, Silva CH, Paranhos Hde F. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning - in vitro evaluation. *Braz Oral Res*. 2015b;29:1-6.
110. Salles, MM. Eficácia da ação antimicrobiana de soluções químicas – hipoclorito alcalino e mamona (*Ricinus communis*) – frente a micro-organismos específicos [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2013.
111. Salloum AM. Effect of 5.25 % sodium hypochlorite on color stability of acrylic and silicone based soft liners and a denture base acrylic resin. *J Indian Prosthodont Soc*. 2014 Jun;14(2):179-86.
112. Sanchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1318-26.

113. Sanita PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Int J Prosthodont*. 2012 May-Jun;25(3):232-44.
114. Sanita PV, Zago CE, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, et al. In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-albicans *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Jul;118(1):84-91.
115. Sartori EA, Schmidt CB, Walber LF, Shinkai RS. Effect of microwave disinfection on denture base adaptation and resin surface roughness. *Braz Dent J*. 2006;17(3):195-200.
116. Sasseville D, Geoffrion G, Lowry RN. Allergic contact dermatitis from chlorinated swimming pool water. *Contact Dermatitis*. 1999 Dec;41(6):347-8.
117. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010 Jul;1(2):100-7.
118. Segundo Ade L, Pisani MX, Nascimento C, Souza RF, Paranhos Hde F, Silva-Lovato CH. Clinical trial of an experimental cleaning solution: antibiofilm effect and integrity of a silicone-based denture liner. *J Contemp Dent Pract*. 2014 Sep 01;15(5):534-42.
119. Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract*. 2000 Feb 15;1(2):28-41.
120. Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont*. 2006 May-Jun;19(3):288-93.
121. 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 Appl Oral Sci*. 2010 Dec;18(6):560-5.
122. Song X, Sun J, Store G, Hansen BF, Olsen I. Colony morphologies, species, and biotypes of yeasts from thrush and denture stomatitis. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(4):248-55.

123. Staniszewska M, Bondaryk M, Pilat J, Siennicka K, Magda U, Kurzatkowski W. Virulence factors of *Candida albicans*. Przegl Epidemiol. 2012;66(4):629-33.
124. Tadeusiak B. Sensitivity to disinfectants of *Candida albicans* strains isolated from the hospital environment. Roczn Panstw Zakl Hig. 1998; 49(1):73-86.
125. Takamiya AS, Monteiro DR, Barao VA, Pero AC, Compagnoni MA, Barbosa DB. Complete denture hygiene and nocturnal wearing habits among patients attending the Prosthodontic Department in a Dental University in Brazil. Gerodontology. 2011 Jun;28(2):91-6.
126. Takano EH, Busso C, Gonçalves AL, Chierice GO, Guimarães-Catazarro SA, Prado-Castro MAA. Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*). Cienc Rural. 2007;37(5):1235-40.
127. Tati S, Davidow P, McCall A, Hwang-Wong E, Rojas IG, Cormack B, et al. *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal candidiasis. PLoS Pathog. 2016 Mar;12(3):e1005522.
128. Tay LY, Jorge JH, Herrera DR, Campanha NH, Gomes BP, Andre Dos Santos F. Evaluation of different treatment methods against denture stomatitis: a randomized clinical study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014 Jul;118(1):72-7.
129. Teixeira FB, Ferraz CCR, Zaia AA, Gomes BPFA, Sousa-Filho FJ, Oliveira DP. Remoção de smear layer dos canais radiculares utilizando o irrigante Endoquill. RBO. 2001;58(6):424-6.
130. Tirapelli C, Landi F, Ribas JP, Panzeri H, Lara EH. Evaluating an experimental dentifrice containing chloramine-T: a preliminary study. Oral Health Prev Dent. 2010;8(4):375-81.
131. Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. Gerodontology. 2008 Dec;25(4):222-8.
132. Verardi G, Cenci MS, Maske TT, Webber B, Santos LR. Antiseptics and microcosm biofilm formation on titanium surfaces. Braz Oral Res. 2016;30. No prelo.
133. Williams DW, Lewis MA. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. Oral Dis. 2000 Jan;6(1):3-11.
134. Yang HF, Pan AJ, Hu LF, Liu YY, Cheng J, Ye Y, et al. *Galleria mellonella* as an in vivo model for assessing the efficacy of antimicrobial agents against *Enterobacter cloacae* infection. J Microbiol Immunol Infect. 2014 Nov 22.

135. Yildirim-Bicer AZ, Peker I, Akca G, Celik I. In vitro antifungal evaluation of seven different disinfectants on acrylic resins. *Biomed Res Int.* 2014;2014:519098.
136. Yilmaz H, Aydin C, Bal BT, Ozcelik B. Effects of disinfectants on resilient denture-lining materials contaminated with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, and *Candida albicans*. *Quintessence Int.* 2005 May;36(5):373-81.
137. Zahir RA, Himratul-Aznita WH. Distribution of *Candida* in the oral cavity and its differentiation based on the internally transcribed spacer (ITS) regions of rDNA. *Yeast.* 2013 Jan;30(1):13-23.
138. Zaremba ML, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Kierklo A, Tokajuk G, et al. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. *Adv Med Sci.* 2006;51 Suppl 1:233-6.
139. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000 Mar-Apr;13(2):136-40.
140. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2011 Feb;49(2):208-11.

Apêndices

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde).

Convidamos você _____, RG: _____, a participar da pesquisa **“Influência do hipoclorito de sódio, Cloramina T e *Ricinus communis* sobre a virulência de espécies de *Candida* no biofilme de próteses totais de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos”** desenvolvida sob a responsabilidade do CD Maurício Malheiros Badaró (Pós-graduando) com a participação do Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza e Profª. Drª. Helena de Freitas Oliveira Paranhos, sob orientação da Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva. Após receber todas as explicações necessárias para a participação na pesquisa, cabe a você decidir de livre e espontânea vontade se quer assinar esse **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** com a finalidade de autorizar sua participação na referida pesquisa.

Sendo assim, esclarecemos que:

1. Esta pesquisa é importante para avaliar produtos para higiene de suas dentaduras e cavidade bucal.
2. O estudo tem por objetivo avaliar alguns produtos líquidos onde as próteses deverão ficar mergulhadas para a limpeza. Você receberá 4 líquidos diferentes (Solução de Mamona a 10%, Solução de Cloramina T a 0,5%, Solução Salina e Solução de Hipoclorito de Sódio a 0,25%); sabão neutro e uma escova específica para escovação de dentaduras.
3. Você deverá escovar suas dentaduras após as refeições (café da manhã, almoço e jantar) utilizando o sabão neutro e a escova. Após a última escovação (depois de jantar), a dentadura deverá ser mergulhada em um copo contendo a solução que você recebeu. Após 7 e 37 dias do início do uso da solução recebida você deverá voltar para a Faculdade para que nós possamos fazer a avaliação. Os pesquisadores entregarão também, as instruções por escrito para lhe ajudar a compreender melhor o estudo.
4. Você deverá realizar também a escovação do céu da boca com escova macia (fornecida pelos pesquisadores) e água.
5. Para avaliar se o produto está limpando ou não, as dentaduras serão avaliadas, na clínica, fora da boca. Para isso, as dentaduras serão coradas com um produto adequado e depois serão escovadas pelos pesquisadores com escova, pasta e água até que fiquem limpas, para então serem devolvidas a você.
6. Quando os pesquisadores estiverem manipulando suas próteses, estas poderão cair no chão, vindo a quebrar-se. Porém todos os cuidados serão tomados por nós para que isso não ocorra, e caso aconteça, serão feitas novas dentaduras imediatamente.
7. Não há previsão de que a pesquisa seja desconfortável ou tenha algum risco para você. Caso ocorra algum dano à sua saúde, em razão da participação na pesquisa, os pesquisadores serão responsáveis por quaisquer despesas e indenizações.
8. Para que a pesquisa possa atingir os objetivos, todos os participantes deverão comparecer à clínica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, FORP/USP, nos dias e horários agendados. Serão 05 semanas (37 dias, com três visitas referentes ao período inicial, após 7 e 37 dias de uso do protocolo de higienização). Sempre que possível, seus retornos para a pesquisa serão realizados nos dias em que você estará recebendo tratamento dentário na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Caso você venha em outro horário, os pesquisadores se comprometem a ressarcir despesas decorrentes da sua participação no estudo, como transporte e alimentação nos dias em que você for chamado para as consultas desta pesquisa.
9. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência integral no decorrer da pesquisa, caso algum dano venha a ocorrer com as dentaduras.
10. A pesquisa não apresenta riscos previsíveis aos participantes, já que se trata de um tratamento baseado apenas na imersão, escovação e coleta de fungos da sua dentadura e palato duro (céu da boca). Você não receberá anestesia, injeções, nem cortes e pontos na boca (sem cirurgia). Essa pesquisa conta apenas com a observação de suas dentaduras e céu da boca.
11. Como benefício, os participantes receberão toda orientação e treinamento para que mantenham suas próteses e céu da boca limpos, com isso uma boa saúde bucal. Além de receberem todos os produtos necessários para a limpeza das dentaduras e céu da boca, durante o período da pesquisa.
12. Os participantes poderão esclarecer qualquer dúvida da pesquisa antes, durante e após a realização do estudo.

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº
14040-904 – RIBEIRÃO PRETO – S.P. – BRASIL

Apêndice A (Continuação) - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

13. Você não terá custos para participar da pesquisa ou para o tratamento envolvido nesta. Você receberá gratuitamente todos os produtos utilizados na pesquisa.
14. Os resultados obtidos serão divulgados em revistas científicas e/ou apresentados em congressos. Garantimos a você que na divulgação dos resultados não permitiremos sua identificação como participante. Também, os pesquisadores manterão sigilo sobre sua participação na pesquisa.
15. Como forma de garantir o sigilo dos participantes, os dados recolhidos durante esta pesquisa serão utilizados exclusivamente para a finalidade apresentada neste protocolo, ou de acordo com o consentimento do participante.
16. Como sua participação é voluntária, você tem o direito de interrompê-la em qualquer momento, sem sofrer penalizações. Caso ocorra algum impedimento sério, que o impossibilite continuar a participar da referida pesquisa, sua desistência não prejudicará o seu atendimento clínico para confecção de novos pares de próteses totais.
17. Caso haja necessidade de suspensão temporariamente ou permanentemente da pesquisa, esta será efetuada somente após análise e manifestação, por parte do CEP/CONEP/CNS/MS que a aprovou, das razões dessa descontinuidade, a não ser em casos de justificativa urgência em benefício de seus participantes.
18. Qualquer dúvida que você tiver, poderá ser esclarecida por um dos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa, durante o desenvolvimento do estudo. Caso necessitar poderá entrar em contato com a Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva e/ou Pós graduando Maurício Malheiros Badaró, pelo telefone (16) 3602 4800, ou com qualquer um dos demais pesquisadores. Caso sinta necessidade, você também poderá entrar em contato com a secretária do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FORP/USP: Marcela Scatolin Calache Telefone: (16) 3602-0493 E-mail: cep@forp.usp.br
Horário de atendimento: das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira (exceto feriados e pontos facultativos).

Este termo é emitido em duas vias de igual teor, sendo a última página assinada por todos os pesquisadores e por você e as demais rubricadas. Você receberá uma das vias e terá o tempo adequado para consultar, se julgar necessário, seus familiares ou outras pessoas para que possam ajudar na tomada de decisão livre e esclarecida.

Após estes esclarecimentos, se você, nominado acima, concordar em participar dessa pesquisa, solicito que assine abaixo.

Ribeirão Preto, ____ de ____ de 201 ____.

Cláudia Helena Lovato da Silva

Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva
CPF: 186456999-80

Raphael Freitas de Souza

Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza
CPF: 269.932.318-75

Helena de Freitas Oliveira Paranhos

Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos
CPF: 258532791-49

Maurício Malheiros Badaró

Pós graduando Maurício Malheiros Badaró
CPF: 802.640.692-34

Diante do exposto acima pelos pesquisadores, estou ciente de que não receberei auxílio financeiro para participar desse estudo. Fui informado de que não haverá riscos previsíveis durante a aplicação dos questionários, mas que posso me manifestar a qualquer momento sobre possíveis desconfortos. Também, que posso fazer perguntas sempre que tiver dúvidas e sair a qualquer momento desse estudo, caso assim seja necessário.

Declaro que li, compreendi e concordo com o presente Termo.

Assinatura do Participante

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº
14040-904 - RIBEIRÃO PRETO - S.P. - BRASIL

Apêndice B – Questionário.

QUESTIONÁRIO

Nome : _____

Informações Sociodemográficas

1. Data de nascimento (idade):

2. Local de nascimento:

3. Gênero: ☐ Masculino ☐ Feminino

4. Nível de escolaridade

- ☐ Não possui ☐ Ensino Fundamental
☐ Ensino Médio ☐ Universitário
☐ Pós Graduação

5. Estado civil

- ☐ Solteiro(a) ☐ Casado(a) ☐ Separado(a) ☐ Divorciado(a) ☐ Viúvo (a)
☐ Outro (especificar):

6. Com que mora?

- ☐ Sozinho ☐ Com outros adultos ☐ Com a família

7. Como compõe a renda familiar?

- ☐ Não compõe ☐ Trabalha: ☐ Aposentadoria
☐ Outro (especificar):

História Médica

1. Você classificaria sua saúde como:

- ☐ Excelente ☐ Muito bom ☐ Bom ☐ Mau ☐ Péssima

2. Estado de Saúde:

Doenças	Sim	Não	Desde
Cancer (tipo):			
Anemia			
Problemas sanguíneos			
Oligoptialismo (redução na produção de saliva)			

Apêndice B (continuação) – Questionário

Diabetes			
Problemas na tireóide			
Neutropenia			
Hipoparatiroidismo			
Doença de Addison (Dano no cortex adrenal – deficiência na produção de hormônios: cortisol; aldosterona; sexuais)			
Depressão			
Doenças Hepáticas (hepatite: A, B, C, cirrose,...)			
Infecções por HIV			
AIDS			
Outros (especificar):			

3. Uso de medicamentos:

Lista de Medicamentos	Sim	Não	Desde
Antibióticos (Clindamicina, eryitromicina, amoxicilina...)			
Corticosteróides (Prednisolone, Betametasona, hidrocortisone)			
Analgésicos/ Não esteroide anti-inflamatório (Aspirina, Ibuprofeno, codeína, Acetaminophen, Morfina ...)			
Antifúngicos (Nistatina, Fluconazol, Amfotericina B ...)			
Psicotrópicos (Chlorpromazin, phenothiazin, lithium carbonate...)			
Laxantes			
Antialérgicos (Chlorpheniramine ...)			
Antihipertensivos (diuréticos, beta bloqueadores, methyldopa ...)			
Anticoagulantes (Heparin, Warfarin, ...)			
Tratamento Hormonal (contraceptivos estrógenos...)			
Imunossupressores (Methotrexate, azathioprine, Penicillamine)			
Antiepiléticos (Carbamazepina, Phenytoin)			
Anticolinérgicos (Biperiden, procyclidine, dihexyverine...)			
Quimioterapia			
Radioterapia			
Outros (Especificar):			

História Odontológica

1. Há presença de algum dos seguintes sinais e sintomas?

Queimação no palato: ☐ Frequentemente ☐ As vezes ☐ Raramente ☐ NuncaQueimação na língua: ☐ Frequentemente ☐ As vezes ☐ Raramente ☐ NuncaDor leve: ☐ Frequentemente ☐ As vezes ☐ Raramente ☐ NuncaMau hálito: ☐ Frequentemente ☐ As vezes ☐ Raramente ☐ NuncaBoca seca: ☐ Frequentemente ☐ As vezes ☐ Raramente ☐ Nunca

Apêndice C - Instruções de higiene.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Materiais Dentários e Prótese

Instruções de Higienização

Como eu devo escovar meu palato (CÉU DA BOCA)? 3 vezes/dia por 2 minutos

- Remova a prótese;
- Passe a escova de dentes que lhe foi fornecida sob água quente para o amolecimento de suas cerdas;
- Não utilize nenhuma pasta de dente (dentífrico);
- Escove o céu da boca (palato) suavemente com movimentos horizontais e verticais por aproximadamente 2 minutos após cada refeição (café da manhã, almoço e jantar);
- Não manusear a área do céu da boca atrás da borda posterior de sua prótese (próximo a garganta).

Como eu devo escovar minha prótese? 3 vezes/dia por 3 minutos

- Escove a dentadura com a escova específica para próteses totais e sabonete líquido, após o café da manhã e após o almoço por 3 minutos.
- Antes de dormir (à noite), retire sua dentadura da boca, enxague com água da torneira e coloque a dentadura em um recipiente com 200 ml da solução que você recebeu e deixe por 20 minutos.
- Retire a dentadura da solução e escove por 3 minutos com o sabonete líquido fornecido. Enxague a dentadura em água corrente.
- Durante o período em que você estiver dormindo, a prótese deverá permanecer em um copo com água limpa e pura. Portanto, **você deverá dormir sem as próteses.**
- A solução para imersão da dentadura será fornecida em frasco contendo o suficiente para 07 dias de uso.

Apêndice D – Atividade antimicrobiana do estudo in vivo do grupo controle.

Figura A1: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de *Baseline* do grupo controle (Cloreto de sódio a 0,85%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. 10^{-2} ; D. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 ; E. 10^{-1} .

Figura A2: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de 7 dias do grupo controle (Cloreto de sódio a 0,85%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. 10^{-2} ; D. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 ; E. 10^{-1} .

Apêndice D (continuação) – Atividade antimicrobiana do estudo in vivo do grupo controle.

Figura A3: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de 37 dias do grupo controle (Cloreto de sódio a 0,85%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10⁰; B. 10⁻¹; C. 10⁻²; D. Coleta da mucosa palatal – diluição 10⁰; B. 10⁻¹.

Apêndice E – Atividade antimicrobiana do estudo in vivo do grupo HS 0,25%.

Figura B1: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de *Baseline* do grupo HS 0,25% (Hipoclorito de sódio a 0,25%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. 10^{-2} ; D. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 ; E. 10^{-1} .

Figura B2: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de 7 dias do grupo HS 0,25% (Hipoclorito de sódio a 0,25%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 ; D. 10^{-1} .

Apêndice E (continuação) – Atividade antimicrobiana do estudo in vivo do grupo HS 0,25%.

Figura B3: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de 37 dias do grupo HS 0,25% (Hipoclorito de sódio a 0,25%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 .

Apêndice F – Atividade antimicrobiana do estudo in vivo do grupo RC 10%.

Figura C1: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de *Baseline* do grupo RC 10% (*R. communis*) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. 10^{-2} ; D. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 ; E. 10^{-1} .

Figura C2: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de 7 dias do grupo RC 10% (*R. communis*) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. 10^{-2} ; D. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 ; E. 10^{-1} .

Apêndice F (continuação)– Atividade antimicrobiana do estudo in vivo do grupo RC 10%.

Figura C3: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de 37 dias do grupo RC 10% (*R. communis*) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. 10^{-2} ; D. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 .

Apêndice G – Atividade antimicrobiana do estudo in vivo do grupo CT 0,5%.

Figura D1: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de *Baseline* do grupo CT 0,5% (Cloramina T a 0,5%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. 10^{-2} ; D. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 ; E. 10^{-1} .

Figura D2: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de 7 dias do grupo CT 0,5% (Cloramina T a 0,5%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 .

Apêndice G (continuação) – Atividade antimicrobiana do estudo in vivo do grupo CT 0,5%.

Figura D3: Avaliação in vivo da ação antimicrobiana (contagem de UFC) correspondente ao período de 37 dias do grupo CT 0,5% (Cloramina T a 0,5%) frente as espécies de *Candida* dos diferentes sítios de coleta: A. Coleta da prótese total – diluição 10^0 ; B. 10^{-1} ; C. Coleta da mucosa palatal – diluição 10^0 .

Apêndice H – Padronização dos valores médios de rugosidade superficial dos espécimes.

Tabela I.1 – Valores médios de rugosidade dos espécimes para os experimentos com *C. albicans*.

N	Face 1				Face 2			
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 2	Média
1	2,92	2,87	2,91	2,90	2,94	2,90	3,52	3,12
2	2,70	3,14	3,36	3,07	3,17	3,21	2,85	3,08
3	3,02	2,99	3,08	3,03	2,93	2,86	3,44	3,08
4	2,99	3,13	3,47	3,20	2,79	3,21	2,71	2,90
5	2,78	3,41	3,48	3,22	3,08	2,86	2,74	2,89
6	3,62	2,80	3,04	3,15	2,84	3,52	3,41	3,26
7	2,92	3,37	2,89	3,06	3,24	3,16	3,55	3,32
8	2,81	3,47	3,51	3,26	3,19	2,93	2,97	3,03
9	2,71	2,97	3,61	3,10	2,71	2,77	2,88	2,79
10	3,35	3,49	3,46	3,43	3,69	2,97	3,51	3,39
11	3,53	3,25	3,41	3,40	2,89	3,09	2,97	2,98
12	3,48	2,77	3,19	3,15	2,71	3,46	2,84	3,00
13	3,11	3,07	3,06	3,08	3,24	3,34	2,77	3,12
14	3,66	3,07	3,63	3,45	3,00	3,26	3,54	3,27
15	3,00	3,66	2,93	3,20	3,05	3,10	3,18	3,11
16	2,90	2,78	3,34	3,01	2,81	2,86	2,81	2,83
17	2,78	3,10	3,47	3,12	2,82	3,60	3,66	3,36
18	3,31	3,17	3,28	3,25	2,79	2,92	2,80	2,84
19	3,46	3,49	3,33	3,43	3,52	3,05	2,91	3,16
20	2,71	2,97	3,08	2,92	3,10	3,59	3,55	3,41
21	3,45	3,57	3,34	3,45	3,20	2,80	3,69	3,23
22	2,77	3,67	3,50	3,31	3,22	2,81	3,51	3,18
23	2,83	3,31	3,48	3,21	3,03	3,63	2,73	3,13
24	2,76	2,81	3,15	2,91	2,85	3,10	2,96	2,97
25	3,54	2,89	3,55	3,33	3,18	3,01	3,45	3,21
26	3,29	2,95	3,10	3,03	2,90	2,78	2,82	2,83
27	3,25	3,38	3,41	3,35	3,38	3,39	3,57	3,45
28	2,80	3,15	3,11	3,02	3,67	3,63	3,58	3,63
29	3,09	3,36	3,24	3,23	3,53	3,09	3,33	3,32
30	3,06	3,38	3,23	3,22	3,43	2,93	3,12	3,16
31	2,89	3,69	3,06	3,21	3,08	3,49	3,23	3,27
32	3,40	3,00	2,91	3,10	3,49	3,01	3,32	3,27
33	2,87	3,21	3,18	3,09	2,94	2,70	3,02	2,89
34	2,72	2,96	2,71	2,80	2,72	2,96	2,85	2,84
35	2,73	2,75	2,74	2,74	2,82	2,76	2,91	2,83
36	2,99	2,99	2,94	2,97	3,27	3,47	2,84	3,19
37	3,01	3,62	3,26	3,30	3,28	3,56	3,66	3,50
38	3,05	3,18	3,70	3,31	3,05	2,90	3,22	3,06
39	3,57	3,41	3,61	3,53	3,17	2,78	2,85	2,93
40	2,88	3,46	3,48	3,27	3,25	3,57	3,36	3,39
41	3,05	3,01	3,07	3,04	3,17	3,48	3,55	3,40
42	2,91	2,82	3,08	2,94	3,36	3,33	3,63	3,44
43	3,48	3,37	3,39	3,41	3,09	2,78	2,90	2,92
44	3,57	3,54	3,68	3,60	2,78	2,90	3,33	3,00
45	3,11	3,10	3,45	3,22	3,32	3,20	3,17	3,23

46	2,87	3,37	3,20	3,15	2,89	3,02	2,99	2,97
47	2,74	2,78	2,96	2,83	2,83	2,72	3,01	2,85
48	3,29	3,49	3,37	3,38	3,56	3,49	3,49	3,51
49	3,27	3,14	2,74	3,05	3,66	3,49	3,13	3,43
50	3,52	3,36	3,57	3,48	2,79	3,01	3,17	2,99
51	3,23	3,56	3,67	3,49	3,60	3,37	3,54	3,50
52	3,16	3,41	3,06	3,21	3,57	3,11	3,28	3,32
53	3,27	3,58	3,08	3,31	3,53	3,48	3,65	3,51
54	3,38	3,32	2,85	3,18	3,64	3,59	3,36	3,53
55	3,69	3,33	3,62	3,55	3,22	2,77	3,04	3,01
56	3,28	3,34	3,12	3,25	3,69	3,69	3,51	3,69
57	2,87	3,24	3,16	3,06	3,55	3,50	3,67	3,57
58	3,49	3,25	3,11	3,28	3,10	3,02	2,96	3,03
59	3,07	2,94	2,84	2,95	3,64	3,19	3,18	3,34
60	3,29	1,77	3,39	2,82	3,70	3,56	3,66	3,64
61	2,98	2,85	2,91	2,91	3,46	2,78	3,33	3,19
62	2,82	2,72	2,87	2,80	3,57	3,51	3,48	3,52
63	2,99	3,05	2,78	2,94	2,77	2,99	2,89	2,88
64	3,25	2,83	2,95	3,01	3,52	3,57	3,51	3,53
65	3,44	3,39	3,61	3,48	2,94	2,74	3,07	2,92
66	3,55	3,58	3,41	3,51	3,09	3,44	3,18	3,24
67	3,52	3,63	3,16	3,44	3,49	3,67	3,55	3,57
68	3,26	3,04	3,07	3,12	3,52	3,30	3,39	3,40
69	2,91	2,74	3,32	2,99	2,99	3,12	3,11	3,07
70	3,31	3,64	3,55	3,50	3,47	3,63	3,54	3,55
71	3,06	3,56	3,02	3,21	3,61	3,60	3,62	3,61
72	3,61	3,27	3,23	3,37	3,49	3,53	3,55	3,52
73	2,70	2,78	2,92	2,80	3,06	3,28	3,21	3,18
74	3,30	3,69	3,58	3,52	3,21	3,62	3,59	3,47
75	3,19	3,61	3,60	3,47	3,30	2,88	3,11	3,10
76	3,51	2,88	3,61	3,33	3,50	3,24	3,28	3,34
77	3,62	3,19	3,17	3,33	2,79	3,12	3,04	2,98
78	3,22	3,13	2,89	3,08	2,75	3,38	3,06	3,06
79	3,35	2,93	2,73	3,00	3,56	3,70	3,50	3,59
80	2,91	3,42	2,90	3,08	3,27	3,28	3,18	3,24
81	3,00	3,13	3,03	3,05	3,70	3,39	3,45	3,51
82	3,45	3,65	3,68	3,59	3,68	3,35	3,58	3,54
83	2,87	2,76	2,71	2,78	3,26	3,54	3,34	3,38
84	3,25	3,26	3,22	3,24	3,48	3,15	3,23	3,29
85	3,64	3,61	3,60	3,62	3,65	3,46	3,65	3,59
86	3,46	3,19	2,98	3,21	2,82	3,55	2,91	3,09
87	3,05	3,59	2,82	3,15	3,14	2,95	2,99	3,03
88	2,81	2,90	2,71	2,81	3,60	3,21	3,06	3,29
89	3,21	2,76	3,56	3,18	3,23	2,97	3,16	3,12
90	2,81	3,57	2,87	3,08	2,82	3,48	3,14	3,15
91	2,94	3,61	2,85	3,13	3,23	2,97	3,25	3,15
92	3,39	3,05	3,33	3,26	2,82	3,48	2,84	3,05
93	2,80	3,15	2,71	2,89	3,04	2,91	2,83	2,93
94	3,55	3,64	3,57	3,59	3,31	3,16	3,21	3,23
95	3,58	3,08	2,75	3,14	3,07	3,68	3,34	3,36
96	2,88	2,91	3,33	3,04	3,38	3,11	3,27	3,25

Apêndice H (continuação) – Padronização dos valores médios de rugosidade superficial dos espécimes.

Tabela I.2 – Valores médios de rugosidade dos espécimes para os experimentos com *C. tropicalis*.

N	Face 1				Face 2			
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 2	Média
1	2,72	3,63	3,19	3,18	3,49	3,19	2,72	3,13
2	2,77	2,82	3,60	3,06	2,70	2,11	3,15	2,65
3	3,32	3,59	3,08	3,33	3,33	3,63	3,55	3,50
4	2,79	2,93	3,34	3,02	3,54	3,15	2,72	3,14
5	2,80	2,74	3,64	3,06	2,84	2,70	2,89	2,81
6	3,69	3,08	3,44	3,40	3,49	3,21	3,33	3,34
7	2,82	3,70	2,90	3,14	3,29	3,26	3,21	3,25
8	2,71	3,21	3,12	3,01	2,91	3,23	2,97	3,04
9	2,79	2,71	3,17	2,89	3,13	2,75	2,78	2,89
10	3,39	3,12	3,62	3,38	2,92	2,79	3,21	2,97
11	3,54	3,52	3,11	3,39	2,90	2,90	2,87	2,89
12	3,86	2,71	2,91	3,16	2,98	3,46	2,94	3,13
13	3,17	3,02	2,86	3,02	3,47	2,75	2,74	2,99
14	3,26	3,08	2,73	3,02	3,04	3,61	3,53	3,39
15	3,04	3,63	3,37	3,35	3,17	3,60	3,28	3,35
16	2,89	2,83	3,47	3,06	2,12	2,53	2,71	2,45
17	2,72	3,07	2,78	2,86	2,23	3,57	3,66	3,15
18	3,36	3,70	2,86	3,31	2,96	2,82	2,70	2,83
19	3,44	3,69	3,56	3,56	3,23	3,52	2,91	3,22
20	2,78	2,77	3,69	3,08	3,30	3,50	3,70	3,50
21	3,49	3,87	3,41	3,59	3,30	2,93	3,19	3,14
22	2,75	3,77	3,02	3,18	3,24	2,91	3,21	3,12
23	2,81	3,41	2,83	3,02	3,32	3,23	2,63	3,06
24	2,73	2,12	2,75	2,53	2,89	3,40	2,77	3,02
25	3,12	2,72	3,68	3,17	2,96	3,03	2,91	2,97
26	2,93	3,07	3,68	3,23	3,30	3,66	3,22	3,39
27	2,82	2,85	3,87	3,18	3,23	2,84	2,94	3,00
28	3,29	2,86	3,29	3,15	3,31	3,15	3,30	3,25
29	2,97	2,75	3,09	2,94	3,55	3,62	3,38	3,52
30	2,76	2,78	3,01	2,85	3,52	2,99	3,18	3,23
31	3,14	3,59	3,08	3,27	3,33	3,67	3,46	3,49
32	3,23	3,23	2,71	3,06	3,52	3,62	3,54	3,56
33	3,20	3,30	3,22	3,24	3,69	3,23	3,33	3,42
34	2,78	2,96	3,21	2,98	3,17	2,75	2,83	2,92
35	3,68	3,47	2,83	3,33	3,50	3,70	3,49	3,56
36	2,74	2,81	2,79	2,78	3,35	3,61	3,29	3,42
37	3,13	3,08	3,48	3,23	3,16	3,45	3,17	3,26
38	2,95	2,78	2,76	2,83	3,06	3,03	2,87	2,99
39	3,67	3,23	3,54	3,48	2,73	2,95	3,35	3,01
40	2,70	2,92	3,30	2,97	3,30	3,06	3,24	3,20
41	2,94	2,83	2,74	2,84	3,37	3,30	3,50	3,39
42	3,54	3,25	2,90	3,23	2,92	3,17	3,11	3,07
43	2,74	2,71	2,92	2,79	2,77	3,00	2,77	2,85
44	3,11	3,53	3,11	3,25	3,18	3,07	3,47	3,24
45	3,54	3,38	3,59	3,50	2,73	3,02	3,20	2,98

46	3,47	2,92	2,78	3,06	3,15	3,04	3,20	3,13
47	3,04	3,58	2,73	3,12	3,64	3,16	3,55	3,45
48	3,46	3,67	3,63	3,59	3,68	3,53	3,61	3,61
49	3,64	3,69	3,38	3,57	3,42	3,10	3,45	3,32
50	2,94	3,19	3,47	3,20	3,18	3,38	3,35	3,30
51	3,64	2,97	2,85	3,15	3,62	3,59	3,55	3,59
52	3,50	3,31	3,07	3,29	3,62	3,37	3,36	3,45
53	3,49	3,07	3,08	3,21	3,27	2,61	3,24	3,04
54	3,10	3,25	3,27	3,21	3,40	2,95	3,41	3,25
55	3,25	3,14	3,24	3,21	2,86	3,21	3,35	3,14
56	3,20	3,27	3,43	3,30	3,39	3,33	3,58	3,43
57	2,83	2,77	2,85	2,82	3,55	3,45	3,63	3,54
58	3,19	3,00	2,87	3,02	3,69	3,09	2,98	3,25
59	2,89	3,14	2,95	2,99	2,84	2,98	3,38	3,07
60	3,09	2,79	2,75	2,88	2,97	3,06	3,22	3,08
61	3,36	3,10	3,18	3,21	2,94	3,07	3,32	3,11
62	3,29	3,53	3,20	3,34	3,00	3,54	3,22	3,25
63	3,08	2,79	2,75	2,87	3,08	3,21	3,32	3,20
64	3,39	3,04	3,13	3,19	3,42	3,63	3,31	3,45
65	3,22	3,57	2,78	3,19	3,48	3,34	3,32	3,38
66	3,16	3,50	2,76	3,14	2,85	3,07	2,92	2,95
67	3,61	3,44	2,94	3,33	2,97	3,03	3,00	3,00
68	3,36	3,00	3,42	3,26	3,00	3,23	3,27	3,17
69	3,30	3,66	3,62	3,53	3,20	3,67	3,59	3,49
70	2,76	3,64	3,10	3,17	3,17	3,12	3,41	3,23
71	3,40	3,18	2,91	3,16	2,80	3,06	3,34	3,07
72	3,10	2,95	2,98	3,01	3,18	2,85	3,56	3,20
73	3,24	3,53	3,67	3,48	3,44	3,11	3,65	3,40
74	3,01	2,95	2,87	2,94	3,19	3,13	3,62	3,31
75	3,22	2,94	3,21	3,12	3,12	3,09	2,90	3,04
76	3,57	3,69	3,25	3,50	2,78	2,92	3,01	2,90
77	2,96	2,85	3,34	3,05	3,33	3,35	3,39	3,36
78	3,60	3,29	3,40	3,43	2,85	2,70	2,99	2,85
79	2,79	2,74	3,04	2,86	3,10	3,24	3,30	3,21
80	3,69	3,64	3,33	3,55	2,97	2,77	3,06	2,93
81	2,75	2,77	2,98	2,83	3,13	3,15	3,01	3,10
82	2,89	3,12	2,89	2,97	2,79	3,14	3,19	3,04
83	3,32	3,26	3,41	3,33	2,99	3,05	3,00	3,01
84	3,13	3,57	3,06	3,25	3,31	3,56	3,42	3,43
85	3,49	3,48	3,49	3,49	3,30	3,59	3,67	3,52
86	3,55	3,67	3,49	3,57	3,47	3,34	3,33	3,38
87	3,66	3,65	3,51	3,61	2,95	3,00	3,01	2,99
88	3,32	2,88	3,39	3,20	2,99	3,15	3,05	3,06
89	3,17	3,28	3,56	3,34	3,41	2,77	2,77	2,98
90	2,94	2,88	2,92	2,91	2,80	3,33	3,28	3,14
91	2,82	2,85	3,36	3,01	3,07	3,37	3,11	3,18
92	3,06	2,81	3,28	3,05	2,80	3,06	2,90	2,92
93	2,95	3,47	3,46	3,29	3,51	3,58	3,49	3,53
94	2,92	2,80	2,73	2,82	3,52	3,55	3,53	3,53
95	3,53	3,49	3,42	3,48	3,01	3,13	3,24	3,13
96	3,47	3,24	3,05	3,25	3,31	3,24	3,15	3,23

Apêndice H (continuação) – Padronização dos valores médios de rugosidade superficial dos espécimes.

Tabela I.3 – Valores médios de rugosidade dos espécimes para os experimentos com *C. glabrata*.

N	Face 1				Face 2			
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 2	Média
1	2,72	3,17	2,98	2,96	2,74	2,42	3,12	2,76
2	2,79	3,58	3,43	3,27	3,64	3,63	2,97	3,41
3	3,22	2,74	3,46	3,14	2,99	2,85	3,04	2,96
4	3,19	3,33	3,11	3,21	2,92	3,64	3,62	3,39
5	3,78	3,21	3,70	3,56	3,21	2,91	3,09	3,07
6	2,82	2,86	3,27	2,98	2,77	3,06	3,10	2,98
7	2,72	3,73	2,91	3,12	3,46	3,09	2,75	3,10
8	3,13	2,92	3,14	3,06	3,29	2,74	3,59	3,21
9	3,31	3,07	3,18	3,19	2,89	2,73	2,84	2,82
10	2,75	3,52	3,13	3,13	3,35	2,78	3,12	3,08
11	2,93	3,67	3,34	3,31	2,67	3,32	2,72	2,90
12	2,83	3,49	3,66	3,33	2,92	3,45	3,40	3,26
13	2,81	3,46	3,61	3,29	3,10	3,48	3,17	3,25
14	2,76	3,27	2,93	2,99	3,09	3,23	2,84	3,05
15	3,06	3,68	2,72	3,15	3,18	3,27	3,68	3,38
16	2,94	2,83	3,06	2,94	2,94	2,84	3,11	2,96
17	2,83	3,19	3,36	3,13	2,87	3,72	2,76	3,12
18	3,59	3,21	3,11	3,30	2,90	2,78	3,03	2,90
19	3,54	3,22	2,93	3,23	3,43	3,41	3,66	3,50
20	3,22	2,71	2,81	2,91	3,60	3,44	2,86	3,30
21	2,85	3,68	2,87	3,13	3,34	2,97	3,19	3,17
22	3,47	3,03	3,21	3,24	3,39	2,51	3,13	3,01
23	3,33	3,48	3,43	3,41	3,12	3,65	2,94	3,24
24	3,61	2,72	3,50	3,28	2,95	3,07	2,76	2,93
25	2,75	2,78	2,76	2,76	3,31	3,14	2,99	3,15
26	2,99	2,79	2,88	2,89	3,57	2,94	2,78	3,10
27	3,44	3,31	3,56	3,44	3,57	3,67	3,30	3,51
28	3,50	3,21	3,65	3,45	3,68	3,59	3,25	3,51
29	3,65	3,58	3,62	3,62	3,44	3,59	3,44	3,49
30	2,89	2,72	2,78	2,80	2,80	2,72	2,79	2,77
31	3,52	3,27	3,65	3,48	3,01	2,98	2,81	2,93
32	2,90	3,01	2,78	2,90	3,63	3,49	3,55	3,56
33	3,40	3,69	3,57	3,55	3,34	3,54	3,29	3,39
34	2,76	2,89	3,43	3,03	3,07	3,54	3,32	3,31
35	3,57	3,31	2,91	3,26	3,36	3,11	3,42	3,30
36	3,69	3,67	3,48	3,61	3,62	3,69	3,56	3,62
37	3,45	3,67	3,69	3,60	2,76	3,51	2,88	3,05
38	2,79	2,81	3,01	2,87	3,05	2,79	2,67	2,84
39	2,94	3,02	2,95	2,97	3,24	3,48	3,27	3,33
40	3,64	3,48	3,65	3,59	3,47	3,46	3,21	3,38
41	3,65	3,58	3,67	3,63	3,06	3,17	3,20	3,14
42	2,72	2,73	2,86	2,77	3,24	3,06	3,17	3,16
43	3,16	2,71	2,88	2,92	3,45	2,74	2,91	3,03
44	2,76	2,74	2,71	2,74	3,48	3,53	2,97	3,33
45	2,85	3,34	3,38	3,19	3,45	3,02	3,31	3,26

46	3,52	3,47	3,40	3,46	3,26	3,60	3,33	3,40
47	3,54	2,97	3,60	3,37	3,36	3,64	3,54	3,51
48	3,36	3,24	3,10	3,23	3,47	3,36	3,24	3,36
49	3,50	3,48	3,65	3,54	2,71	3,54	3,00	3,08
50	3,33	2,86	3,00	3,06	3,42	3,52	3,48	3,47
51	3,40	3,16	3,53	3,36	2,71	3,59	3,03	3,11
52	3,53	3,47	3,44	3,48	3,02	3,47	3,41	3,30
53	3,33	3,03	3,64	3,33	3,11	3,40	3,29	3,27
54	2,83	3,49	3,30	3,21	2,90	3,07	3,25	3,07
55	3,36	2,92	3,27	3,18	2,98	3,50	3,42	3,30
56	3,47	3,52	3,44	3,48	2,88	2,78	2,99	2,88
57	3,48	3,46	3,51	3,48	2,83	3,05	2,96	2,95
58	3,65	3,44	3,58	3,56	2,90	3,36	3,31	3,19
59	2,85	3,05	3,53	3,14	2,98	2,72	2,66	2,79
60	3,45	3,67	3,69	3,60	3,60	2,91	3,15	3,22
61	3,23	3,51	2,91	3,22	2,88	3,46	3,23	3,19
62	3,30	3,54	3,49	3,44	3,50	3,37	3,36	3,41
63	3,58	3,47	3,44	3,50	3,25	3,28	3,52	3,35
64	3,43	3,54	3,64	3,54	2,85	3,50	2,90	3,08
65	3,45	3,28	3,47	3,40	3,15	3,15	3,26	3,15
66	3,44	3,63	3,61	3,56	3,14	3,25	3,12	3,17
67	2,72	3,10	2,70	2,84	3,04	2,96	3,12	3,04
68	3,04	3,47	3,53	3,35	3,57	2,97	3,48	3,34
69	2,82	2,88	3,11	2,94	2,78	3,43	3,26	3,16
70	2,70	2,92	3,03	2,88	3,34	3,06	3,64	3,35
71	2,89	2,89	2,76	2,85	2,98	3,31	2,89	3,06
72	3,20	3,36	3,41	3,32	2,91	2,81	2,93	2,88
73	3,35	3,58	3,38	3,44	3,61	3,63	3,58	3,61
74	3,29	3,63	3,08	3,33	3,07	2,85	3,13	3,02
75	3,46	3,26	3,62	3,45	3,60	3,69	3,58	3,62
76	2,81	3,13	2,86	2,93	3,57	3,44	3,47	3,49
77	3,70	3,27	3,50	3,49	3,10	3,49	3,29	3,29
78	3,62	3,57	3,69	3,63	3,21	2,82	3,07	3,03
79	2,82	3,43	3,38	3,21	3,34	3,35	3,35	3,35
80	3,20	3,13	3,23	3,19	3,29	3,27	3,31	3,29
81	3,25	3,40	3,56	3,40	3,13	3,70	3,15	3,33
82	3,28	3,48	3,45	3,40	2,94	2,81	2,90	2,88
83	3,23	3,51	2,39	3,04	2,82	2,86	2,91	2,86
84	3,06	2,97	2,73	2,92	3,41	3,29	3,17	3,29
85	3,50	3,60	3,10	3,40	2,81	2,95	3,02	2,93
86	2,83	2,71	2,89	2,81	3,29	3,30	3,27	3,29
87	3,38	3,61	3,40	3,46	2,97	2,84	2,76	2,86
88	3,46	3,57	3,33	3,45	2,71	2,72	2,77	2,73
89	3,34	3,38	3,17	3,30	2,78	2,89	2,81	2,83
90	3,19	3,29	3,26	3,25	2,70	2,82	2,83	2,78
91	3,60	3,59	3,27	3,49	2,83	2,80	2,92	2,85
92	3,07	3,45	3,53	3,35	3,26	2,91	2,93	3,03
93	3,48	3,22	3,61	3,44	3,54	3,22	3,39	3,38
94	3,34	3,36	3,55	3,42	3,22	2,94	3,15	3,10
95	3,46	3,43	3,69	3,53	3,11	3,52	3,23	3,29
96	3,61	3,77	3,54	3,64	2,81	2,79	2,89	2,83

Apêndice I – Atividade antimicrobiana do estudo in vitro.

Figura 1: Avaliação in vitro da ação antimicrobiana (contagem de UFC) do grupo controle (água destilada estéril): A. *C. albicans*; B. *C. tropicalis*; C. *C. glabrata*.

Figura 2: Avaliação in vitro da ação antimicrobiana (contagem de UFC) do grupo HS 0,25% (Hipoclorito de sódio): A. *C. albicans*; B. *C. tropicalis*; C. *C. glabrata*.

Apêndice I (continuação) – Atividade antimicrobiana do estudo in vitro.

Figura 3: Avaliação in vitro da ação antimicrobiana (contagem de UFC) do grupo RC 10% (*R. communis*): A. *C. albicans*; B. *C. tropicalis*; C. *C. glabrata*.

Figura 4: Avaliação in vitro da ação antimicrobiana (contagem de UFC) do grupo CT 0,5% (Cloramina T): A. *C. albicans*; B. *C. tropicalis*; C. *C. glabrata*.

Anexos

Anexo A - Comitê de ética (número de processo e aprovação).

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Expressão de genes de virulência e fatores de virulência de espécies de *Candida* spp. identificadas no biofilme de próteses totais após o uso de soluções higienizadoras

Pesquisador: Maurício Malheiros Badaró

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34811414.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 801.090

Data da Relatoria: 22/09/2014

Apresentação do Projeto:

O objetivo do estudo é avaliar a influência de soluções higienizadoras para imersão de próteses totais sobre a expressão de genes de virulência e de fatores de virulência de diferentes espécies de *Candida*, identificadas no biofilme de próteses totais e na cavidade bucal de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. Serão selecionados participantes saudáveis (n=80; grupo S) e imunocomprometidos por Diabetes tipo II (n=80; grupo I), os quais serão distribuídos aleatoriamente em grupos paralelos (n=10) em função das soluções Sa – salina (controle); HS - Hipoclorito de sódio 0,5%; RC – *Ricinus communis* a 10%; CT – Cloramina T a 0,5%. Eles serão orientados a escovar suas próteses e o palato 3 vezes ao dia, e imergir os aparelhos protéticos por 20 minutos nas soluções. O período experimental será de 30 dias. Amostras de biofilme serão coletadas no Baseline, após 1 e 30 dias do uso de cada solução para a identificação das espécies de *Candida* pelo método de cultura microbiana (CHROMAgar) e por RT-PCR (rDNA). As amostras positivas serão selecionadas para a avaliação dos níveis de expressão dos genes dos de virulência (ERG11, HWP-1, CDR1,

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

Anexo A (Continuação) - Comitê de ética (número de processo e aprovação).**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP**

Continuação do Parecer: 801.090

2.2 Autorização da Infraestrutura da Clínica: Neste termo, estão presentes os 5 nomes dos pesquisadores descritos na Plataforma Brasil. Porém, no Projeto de Pesquisa enviado à FAPESP são citados 6 pesquisadores.

CONSIDERAÇÃO ATENDIDA. OS NOMES DOS PESQUISADORES FORAM ADEQUADOS NESTE TERMO DE AUTORIZAÇÃO E NO PROJETO DE PESQUISA..

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado. Os relatórios (parciais/final) deverão ser encaminhados, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte – canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 172ª R.O. do CEP.

RIBEIRAO PRETO, 23 de Setembro de 2014

Assinado por:
JOSÉ TARCÍSIO LIMA FERREIRA
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº**Bairro:** Monte Alegre**CEP:** 14.040-904**UF:** SP**Município:** RIBEIRAO PRETO**Telefone:** (16)3602-0251**Fax:** (16)3602-4102**E-mail:** cep@forp.usp.br

Página 08 de 08

Anexo B – Emenda submetida ao Comitê de ética (número de processo e aprovação).

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO/ FORP/ USP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DA EMENDA		
Título da Pesquisa: Avaliação da influência de soluções de higiene sobre fatores de virulência de biofilmes específicos.		
Pesquisador: Maurício Malheiros Badaró		
Área Temática:		
Versão: 4		
CAAE: 34811414.0.0000.5419		
Instituição Proponente: Universidade de São Paulo		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.795.206		
Apresentação do Projeto:		
Formulário de Relatório Parcial		
Objetivo da Pesquisa:		
conforme projeto		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
conforme projeto		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
Pesquisa bem delineada e de interesse clínico		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
Foram apresentados o formulário de Relatório Parcial, devidamente preenchido com as justificativas e relatando estar na fase estatística. As modificações no título e a retirada das propostas que não podem ser realizadas por falta de recurso foram inseridas na Plataforma.		
Recomendações:		
Aprovado.		
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:		
Aprovado.		
Endereço: Avenida do Café s/nº Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br		

Página 01 de 03

Anexo B (Continuação) – Emenda submetida ao Comitê de ética (número de processo e aprovação).

Continuação do Parecer: 1.795.206

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 197ª Reunião CEP/FORP/USP, realizada em 26/10/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_720860 E2.pdf	03/10/2016 19:14:55		Aceito
Outros	Relatorio_parcial_informando_alteracoes.doc	03/10/2016 19:11:34	Maurício Malheiros Badaró	Aceito
Outros	formulario_relatorio_parcial.doc	18/05/2016 13:50:03	Maurício Malheiros Badaró	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto0001.pdf	26/05/2015 19:33:02		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	25/05/2015 14:14:52		Aceito
Outros	Autorização de infra-estrutura. Clínica corrigida.pdf	08/09/2014 23:03:14		Aceito
Outros	Autorização de infra-estrutura laboratorial corrigida.pdf	08/09/2014 23:02:21		Aceito
Outros	Encaminhamento.pdf	27/08/2014 21:31:20		Aceito
Outros	Declaração de participação do paciente.pdf	27/08/2014 21:30:46		Aceito
Outros	Autorização de infraestrutura clínica.pdf	27/08/2014 21:30:03		Aceito
Outros	Autorização de infraestrutura laboratorial.pdf	27/08/2014 21:29:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/08/2014 21:28:48		Aceito
Outros	RESPOSTA AO COMITÊ DE ÉTICA.pdf	27/08/2014 21:27:10		Aceito
Outros	Autorização da infraestrutura Laboratorial.pdf	07/08/2014 15:30:45		Aceito
Outros	Autorização da infraestrutura clínica.pdf	07/08/2014 15:30:09		Aceito
Outros	Declaração de participação do paciente.pdf	07/08/2014 00:17:42		Aceito
Outros	Autorização da infraestrutura0001.pdf	07/08/2014 00:16:45		Aceito
TCLE / Termos de	Termo de consentimento página 2.	07/08/2014		Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº
 Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

Página 02 de 03

Maurício Malheiros Badaró

Anexo B (Continuação) – Emenda submetida ao Comitê de ética (número de processo e aprovação).

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO/ FORP/ USP
Continuação do Parecer: 1.795.206					
Assentimento / Justificativa de Ausência	pdf	00:12:57			Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de consentimento página 1.pdf	07/08/2014 00:12:15			Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Comite de Etica.pdf	04/08/2014 16:09:37			Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 27 de Outubro de 2016

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº		CEP: 14.040-904
Bairro: Monte Alegre		
UF: SP	Município: RIBEIRAO PRETO	
Telefone: (16)3315-0493	Fax: (16)3315-4102	E-mail: cep@forp.usp.br

Página 03 de 03