UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS DENTÁRIOS E PRÓTESE

FLÁVIA CRISTINA TARGA COIMBRA

# *Avaliação in vitro da suscetibilidade de biofilme multiespécies às soluções de peróxidos*

Ribeirão Preto
2018

**FLÁVIA CRISTINA TARGA COIMBRA**

# *Avaliação in vitro da suscetibilidade de biofilme multiespécies às soluções de peróxidos*

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

**Área de Concentração:** Odontologia (Reabilitação Oral)

**Orientadora:** Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos

**Versão Corrigida**

Ribeirão Preto
2018

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

Coimbra, Flávia Cristina Targa

*Avaliação in vitro da suscetibilidade de biofilme multiespécies às soluções de peróxidos.* Ribeirão Preto, 2018.

135p. : il. ; 30cm

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

Orientadora: Paranhos, Helena de Freitas Oliveira

1. Biofilmes. 2. Higienizadores de Dentadura. 3. Produtos com Ação Antimicrobiana. 4. Prótese total.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: COIMBRA, Flávia Cristina Targa

Título: **Avaliação in vitro da suscetibilidade de biofilme multiespécies às soluções de peróxidos.**

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

Área de Concentração: Odontologia (Reabilitação Oral)

Aprovado em: ____/____/ 2018

## BANCA EXAMINADORA

**Prof.(a) Dr.(a)** _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**Prof.(a) Dr.(a)** _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**Prof.(a) Dr.(a)** _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**Prof.(a) Dr.(a)** _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**Prof.(a) Dr.(a)** _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

# Dedicatória

*A **Deus**, por suas bênçãos, força e proteção.*

*Aos meus pais, **Dulcinete e Antônio Carlos** , por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo amor, dedicação, ensinamentos e apoio incondicional que tornaram possível a realização dos meus sonhos.*

*A minha querida irmã, **Thais**, pelo amor, companheirismo e cuidado. Obrigada pela torcida, pelo carinho e proteção durante a minha caminhada.*

*Aos meus avôs **Nelson e Florinda**, pelos exemplos de vida, pelo amor incondicional e eterno, por tudo que me proporcionaram e pela dedicação que me fez chegar até aqui.*

*A todos que torceram por mim e colaboraram para a realização desse trabalho, meu eterno agradecimento!*

# Agradecimento Especial

*À **Profª Drª Helena de Freitas Oliveira Paranhos**, minha orientadora, pela dedicação, acolhimento e oportunidade. Muito obrigada pelos ensinamentos, confiança e orientação durante toda a minha caminhada. Pelo exemplo de pessoa e profissional, dedicação e apoio, meu eterno agradecimento, carinho e admiração.*

# Agradecimentos

*À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** da Universidade de São Paulo, representada pela **Diretor a Profª Drª Léa Assed Bezerra da Silva**, pela oportunidade de cursar o Doutorado.*

*Ao **Prof Dr Ricardo Faria Ribeiro**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação na Área de Reabilitação Oral, pela dedicação, comprometimento com a nossa formação, incentivo e exemplo.*

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

*À **Profª Drª Cláudia Helena Lovato da Silva**, pela proximidade, amizade, carinho e ensinamentos. Pela disponibilidade, dedicação e pelo exemplo de ser humano e profissional.*

*À **Profª Drª Valéria Oliveira Pagnano de Souza**, pela dedicação, amizade, e confiança. Pela disponibilidade, carinho e suporte. Meu eterno agradecimento.*

*À **Ana Paula Macedo**, por todo carinho e cuidado durante toda a minha caminhada. Muito obrigada pela amizadade, suporte, conselhos, disponibilidade e ajuda para tornar possível a realização deste trabalho. Meu eterno agradecimento.*

*Aos **Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por todos os ensinamentos e contribuição essencial para minha formação.*

*Às Funcionárias da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Regiane de C. Tirado Damasceno**, **Fernanda Talita de Freitas** e **Denise Martins Fontes Gonçalves** pela dedicaçõ, atenção e disponibilidade.*

*Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da universidade de São Paulo,* ***Mary Possani Carmessano e Carlos Feitosa dos Santos****, pela paciência, disponibilidade, ajuda e orientações.*

*À Técnica do laboratório de Reabilitação Oral, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,* ***Viviane de Cássia Oliveira****, pela dedicação, convivência, carinho, suporte técnico e auxílio para a realização desse trabalho.. Muito obrigada por sua ajuda, seus ensinamentos, sugestões e conselhos.*

*A todos os* ***colegas da Pós-Graduação****, pela amizade, carinho, atenção, apoio e por todos os momentos de convivência. Obrigada pelas ideias e conhecimentos compartilhados, que foram essenciais para minha formação pessoal e profissional.*

*Às queridas amigas,* ***Carolina Noronha Ferraz de Arruda, Milena Mangueira Rocha e Glenda Lara Lopes Vasconcelos****, pela convivênvia, ensinamentos e amizade durante esses anos. Obrigada por fazerem parte da minha história.*

*Meu eterno agradecimento a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.*

# Resumo

**RESUMO**

COIMBRA, FCT. **Avaliação in vitro da suscetibilidade de biofilme multiespécies às soluções de peróxidos**. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2018.

O objetivo desse estudo in vitro foi avaliar a efetividade antimicrobiana de higienizadores à base de peróxidos frente a biofilme multiespécies e o impacto dessas soluções na redução da carga microbiana, atividade metabólica e do biofilme agregado. A partir de matrizes circulares metálicas (15 x 3 mm), foram confeccionados corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável os quais foram esterilizados em micro-ondas (650W, por 6 minutos) e inoculados com suspensão de $10^5$ UFC/mL de *Candida albicans* (Ca) *e* $10^6$ UFC/mL de *Staphylococcus aureus* (Sa) e de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). Após contaminação, os corpos de prova foram incubados a 37 ºC por 20 h e, em seguida, por meio de uma cesta de aço inoxidável, foram imersos em Béquer com as seguintes soluções, de acordo com as instruções do fabricante (n=9): Grupo CP (Controle positivo) - imersão em PBS (Phosphate-Buffered Saline); Grupo MI – NitrAdine e Grupo FX – Fixodent. Em seguida, foram lavados (PBS) e imersos em meio de cultura Letheen, para a avaliação da esterilidade e obtenção de diluições seriadas ($10^0$ a $10^{-3}$), as quais foram semeadas em meios de cultura específicos: CHROMagar Candida para *C. albicans*, Manitol Salt Agar para *S. aureus* e Agar Cetrimide para *P. aeruginosa*. Após incubação, de acordo com morfologia típica, o número de colônias características foi mensurado e o número de UFC/mL calculado. A avaliação da atividade metabólica foi realizada pelo método de redução do XTT e a viabilidade celular foi avaliada por microscopia de epifluorescência (n=2). Os dados obtidos para as variáveis de UFC/mL (Sa e Pa), Unidades de Absorbância e Percentual de Área, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($\alpha$=0,05). Para comparação entre os dados vinculados (Percentual de área de células vivas e totais) empregou-se também o teste de Wilcoxon. Os dados da variável de UFC/mL para *C. albicans* foram avaliados pelo teste de ANOVA e pós-teste de Tukey, uma vez que apresentaram distribuição normal. Os resultados de UFC/mL mostraram diferença significativa entre os grupos (Ca p=0,002, Pa p<0,001e Sa p<0,001) havendo redução significante do número de UFC/mL de *C. albicans* [MI: 2,13 (1,17)], de *P. aeruginosa* [FX: 2,96 (1,76 – 4,17) e MI: 0,00 (-0,43 – 2,06)] e *S. aureus* [FX: 3,59 (2,97 – 4,31) e MI: 1,90 (0,40 – 3,01)], quando comparado aos grupos controles [CP:Ca: 4,02 (0,85), CP:Pa: 6,43 (6,02 – 6,61) e CP:Sa: 5,67 (5,41 – 6,31)]. Houve redução da atividade metabólica do biofilme multiespécies (p<0,001), em ambas as soluções higienizadoras [FX: 0,001 (-0,006 – 0,058) e MI: 0,000 (- 0,002 – 0,066)] quando comparadas ao Grupo Controle [CP: 0,068 (0,046 – 0,190)]. As imagens da microscopia de epifluorescência revelaram redução significativa da área de biofilme agregado sobre os corpos de prova após a imersão nos higienizadores [FX: 85,19 (77,23 – 86,42) e MI: 78,42 (70,91 – 81,65)] quando comparados ao grupo controle (p<0,001). Na comparação entre as áreas de biofilme vivo e total pode-se observar diferenças entre as áreas do biofilme multiespécies (p<0,001), após a imersão nos higienizadores avaliados. Conclui-se que os higienizadores de prótese conseguiram

reduzir a atividade metabólica bem como o biofilme agregado, embora nenhum higienizador tenha conseguido remover completamente o biofilme multiespécies. O higienizador NitrAdine foi o mais efetivo na redução da carga microbiana do biofilme multiespécies. A *P. aeruginosa* foi mais suscetível a ação dos higienizadores do que o *S. aurueus* e *C. albicans*, quando associada em biofilme multiespécies.

**Palavras-chave:** Biofilmes, Higienizadores de Dentadura, Produtos com Ação Antimicrobiana, Prótese Total.

# Abstract

**ABSTRACT**

COIMBRA, FCC**. In vitro evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms to peroxides solutions**. Ribeirão Preto School of Dentristy, University of São Paulo, Brazil; 2018.

The objective of this in vitro study was to evaluate the peroxides soluions antimicrobial effectiveness of against the viability of multispecies biofilm and the impact of these solutions on the reduction of microbial load, metabolic activity and biofilm aggregate. Acrylic resin specimens were obtained by a circular metal matrix (15 × 3 mm), sterilized with microwave irradiation (650 W, 6 min) and contaminated with contaminated with $10^5$ CFU/mL suspension of *Candida albicans* (Ca) and $10^6$ CFU/mL suspensions of *Staphylococcus aureus* (Sa) *and Pseudomonas aeruginosa* (Pa). After contamination, the specimens were incubated at 37 ° C for 20 hours and then immersed in Becker through a stainless-steel basket, on the following solutions according to the manufacturer's instructions (n=9): Group CP (positive control) – immersion in PBS (Phosphate-Buffered Saline); Group MI – NitrAdine and Group FX - Fixodent. The specimens were washed (PBS) and immersed in Letheen culture medium, to evaluate sterility and obtain serial dilutions ($10^0$ to $10^{-3}$), that were seed into specific medium: CHROMagar Candida for *C. albicans*, Manitol Salt Agar for *S. aureus* and Agar Cetrimide for *P. aeruginosa*. After incubation, in accordance with characteristic morphology, the number of characteristic colonies was counted and the number of CFU/mL calculated. The evaluation of metabolic activity was performed by the XTT reduction assay and cell viability was evaluated by epifluorescence microscopy. The data obtained for the variables of CFU (Sa and Pa), Absorption Units and Area Percentage were evaluated by the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn test ($\alpha$=0.05). The Wilcoxon test was used to compare the paired data (percentage of live and total cell area). Data from the variable of UFC/mL for C. albicans were evaluated by the Anova test and Tukey's post-test, since they presented a normal distribution. The results of UFC/mL showed significant differences between groups (Ca p=0.002, Pa p<0.001e Sa p<0.001) with significant reduction in the number of CFU/mL of *C. albicans* [MI: 2.13 (1.17)], *P*. aeruginosa [FX: 2.96 (1.76 – 4.17); MI: 0.00 (-0.43 – 2.06)] and *S. aureus* [FX: 3.59 (2.97 – 4.31); MI: 1.90 (0.40 – 3.01)], when compared with control group [CP:Ca: 4.02 (0.85), CP:Pa: 6.43 (6.02 – 6.61) e CP:Sa: 5.67 (5.41 – 6.31)]. There was reduction in the metabolic activity of the multispecies biofilm in both denture cleanser [FX: 0.001 (-0.006 – 0.058) e MI: 0.000 (- 0.002 – 0.066)] when compared with control group [CP: 0.068 (0.046 – 0.190)]. The epifluorescence microscopy images revealed a significant reduction of the biofilm area on the specimens after immersion in the denture cleansers [FX: 85.19 (77.23 – 86.42) e MI: 78.42 (70.91 – 81.65)] when compared with control group (p<0.001). In live and total biofilm areas comparison it was possible to observe differences between the areas of the multispecies biofilm

(p<0,001), after immersion in the denture cleansers evaluated. It was concluded that the denture cleansers were able to reduce metabolic activity as well as the aggregate biofilm, although none of the cleansers was able to completely remove the multispecies biofilm. NitrAdine was the most effective in reducing the microbial load of multispecies biofilm. *P. aeruginosa* was more susceptible to the action of denture clenasers than *S. aureus* and *C. albicans*, when associated with multispecies biofilms.

**Keywords:** Biofilms, Denture Cleansers, Products with Antimicrobial Actions, Complete Denture.

# Sumário

## SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO** ..... **31**
**2. PROPOSIÇÃO** ..... **43**
**3. MATERIAL E MÉTODOS** ..... **47**
3.1 Delineamento experimental ..... **49**
3.2 Confecção dos corpos de prova ..... **49**
3.2.1 Prensagem ..... 50
3.2.2 Desinclusão e Acabamento ..... 51
3.2.3 Padronização da rugosidade ..... **52**
3.2.4 Esterilização dos corpos de prova ..... **52**
3.3 Soluções Higienizadoras ..... **52**
3.3.1 Avaliação do pH dos higienizadores ..... **53**
3.4 Biofilme ..... **53**
3.4.1 Preparação do Inóculo ..... **54**
3.4.2 Desenvolvimento do biofilme multiespécies ..... 56
3.5 Imersão nas soluções higienizadoras ..... 58
3.6 Unidades Formadoras de Colônias ..... 59
3.7 Avaliação da atividade metabólica do biofilme ..... 60
3.8 Viabilidade do biofilme ..... **62**
3.9 Análise Estatística ..... **66**
**4. RESULTADOS** ..... **67**
4.1 Análise de esterilidade ..... 69
4.2 Avaliação do pH e peso de cada higienizador ..... 69
4.3 Análise da atividade antimicrobiana das soluções higienizadoras ..... 69
4.4 Avaliação da atividade metabólica ..... 72
4.5 Avaliação da viabilidade do biofilme ..... 74
**5. DISCUSSÃO** ..... **77**
**6. CONCLUSÃO** ..... **87**
**REFERÊNCIAS** ..... **91**
**APÊNDICES** ..... **105**

# 1. Introdução

# 1. INTRODUÇÃO

Atualmente há 901 milhões de idosos na população mundial, o que proporcionalmente, significa que uma em cada nove pessoas no mundo tem 60 anos ou mais (United Nations, 2015). Segundo as estimativas, a previsão é que essa proporção aumente para uma em cada cinco pessoas em 2050, atingindo um total de 2 bilhões de idosos na população mundial (22% da população global) (Gúzman et al., 2012). Se, por um lado, os avanços contínuos nos cuidados de saúde propiciaram aumento da população mundial de idosos; por outro, está diminuindo o número de pacientes edêntulos a taxa média de 1% ao ano na maioria dos países desenvolvidos (Douglas et al., 2002). Entretanto, em decorrência da crescente expectativa de vida média, o número de pacientes edêntulos permanecerá aumentando nas próximas décadas (Douglas et al., 2002; Cooper, 2009; Papadaki et al., 2012).

Nos Estados Unidos, por exemplo, embora o aumento da população de idosos irá superar o declínio das taxas de edentulismo, o número de maxilas edêntulas aumentará de 53,8 milhões (1991), para 61,0 milhões em 2020 (Douglas et al., 2002). Projeções para a Finlândia, Suécia e Reino Unido revelam que o edentulismo tenderá a diminuir em até 60% nos próximos 20 anos nesses países (Mojon et al., 2004). O Brasil, entretanto, ainda apresenta alta prevalência de edêntulos, principalmente entre a população idosa. Projeções futuras observam tendências crescentes até 2040, com expectativa de 64 milhões de idosos edêntulos no país (Cardoso et al., 2016).

O envelhecimento populacional implicará inevitavelmente em maiores desafios para prestação e cuidados de atenção à saúde sistêmica e oral como condição fundamental para uma vida mais saudável (O'Donnell et al., 2016). Vários estudos relatam a associação entre doenças orais e sistêmicas, como doenças cardiovasculares e infecções respiratórias (Sumi et al., 2002; Coulthwaite et al., 2007; Coco et al., 2008; Glass et al., 2010; Pereira-Cenci et al., 2010; Pizzo et al., 2010; Peters et al., 2012; Felton, 2016; Suma et al., 2018). Estudos mostram que vários casos de pneumonia estão relacionados a bactérias orais originadas da orofaringe (Terpenning et al., 2001; Sumi et al., 2002, Coulthwaite & Verran, 2007, Pizzo et al., 2010; O'Donnell et al., 2016).

O ambiente orofaríngeo é um ambiente complexo que está continuamente exposto a vários micro-organismos patogênicos oportunistas, incluindo fungos e bactérias, com capacidade de se relacionar e se organizar na forma de biofilmes (Terpenning et al., 2001; Peters et al., 2012). A presença de células em estado planctônico nos biofilmes possibilita a colonização de novos nichos no organismo, tendo em vista a capacidade dessas células de se desprenderem dos biofilmes (Terpenning et al., 2001; Sumi et al., 2002; Smith et al., 2003), situação que tendem a se agravar com o uso de próteses precárias para a reabilitação oral, uma vez que esses micro-organismos também são capazes de aderir a superfícies abióticas (Chandra et al., 2001; Baena-Monroy et al.,2005; Coenye et al., 2008; Azevedo et al., 2012) e formar biofilmes multiespécies de difíceis controle (Chandra el al., 2001; Baena-Monroy et al.,2005; Coenye et al., 2008; Azevedo et al., 2012).

Estima-se que mais da metade de todas as infecções microbianas estão relacionadas à presença de biofilmes (Donlan et al., 2002; Peters et al., 2012). Os biofilmes são comunidades complexas sésseis, em que células de vários micro-organismos estão presentes. Estas células estão ligadas uma à outra e cercadas por uma matriz polimérica extracelular (Donlan et al., 2002), constituída principalmente por polissacarídeos, DNA, proteínas e células mortas (Branda et al., 2005). A capacidade de interação entre essas células, conhecida como “quorum sensing” (Nadell et al., 2008), possibilita a modulação de fatores de proteção de forma a conseguir rápida adaptação frente as alterações do meio, mediante a presença de antimicrobianos e células de defesa do hospedeiro. A produção de matriz pode restringir a penetração de agentes antimicrobianos, levar ao acúmulo de enzimas degradantes de antibióticos, como também pode afetar o pH, a concentração de oxigênio e a disponibilidade de nutrientes nas camadas mais profundas do biofilme (Donlan & Costerton 2002, Henriques et al., 2013). Adicionalmente, a transferência de genes de resistência, favorecidos pela alta densidade e diversidade celular, também contribui para maior resistência dos biofilmes (Donlan & Costerton 2002; Peters et al. 2012; Henriques et al., 2013).

Os biofilmes presentes nas próteses, nos dentes e na mucosa são distintos em termos de diversidade e composição (O’Donnell et al., 2015). As diferentes localizações anatômicas provavelmente explicam essas diferenças, visto que as superfícies aderentes e o ambiente circundante podem ser mais adequados para o crescimento de determinada diversidade microbiológica (Zaura et al., 2009,

O'Donnell et al., 2015). Na cavidade bucal a saliva é importante fonte de nutrientes para os micro-organismos (Humphrey et al., 2001), entretanto a prótese pode atuar como barreira para a formação de menor nicho sustentável (Zaura et al., 2009). O'Donnell et al. (2015) mostraram que a presença da dentição natural causa impacto significativo na diversidade do microbioma oral de um usuário de próteses dentáris.

Fatores como a própria característica do polimetilmetacrilato utilizado para a confecção das bases protéticas (Harrison et al., 2004; Li et al., 2010; Glass et al., 2010; Raj et al., 2013) e a formação de películas de proteínas salivares sobre as bases (Gocke et al., 2002) influenciam a adesão microbiana, tornando a prótese um reservatório de micro-organismos de diferentes potenciais patogênicos (Powell et al., 1990; Nikawa et al., 1998; Morales et al., 2010; Ribeiro et al., 2012). Logo, dado que parte significativa dos idosos usa algum tipo de prótese dentária (Coulthwaite et al., 2007; Donell et al ., 2016), e que à medida que a população envelhece, aumenta o impacto local e sistêmico das doenças bucais (El-Soh et al., 2011; Gúzman et al., 2012; O'Donnell et al., 2016), maior, portanto, é a suscetibilidade desses pacientes a desenvolver infecções persistentes, e até mesmo potencialmente fatais (Abe et al., 2001; Maeda et al., 2007; Lee et al., 2009; Altieri et al., 2012; Kart et al., 2016). Estudo recente mostrou que pacientes que dormem com a prótese duplicam o risco de desenvolver pneumonia (Limuna et al., 2015) devido ao aumento da carga microbiana no biofilme protético e à proximidade da prótese ao trato respiratório que potencializa o risco de aspiração de patógenos oportunistas (Limuna et al., 2015, O'Donnell et al., 2015).

Em estudo recente, O'Donnell et al. (2016) identificaram em 64,6% das próteses avaliadas níveis significativos de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, além de outros potenciais patógenos respiratórios como *S. pneumoniae*, *H. influen*zae *B*, *S.pyogenes* e *M. catarrhalis*. O *S. aureus* foi o patógeno mais prevalente, presentes em 51,2% das próteses. Outros patógenos frequentemente isolados em próteses dentárias tanto de indivíduos saudáveis (64%), como pacientes com estomatite protética (78%) são as espécies de *Candida*. Essas espécies geralmente representam 30 a 60% da microbiota oral em indivíduos saudáveis e 60 a 100% da microbiota em usuários de próteses totais (Loster et al., 2012).

Embora atualmente sejam conhecidas aproximadamente 200 espécies de *Candida* somente 10% delas podem causar algum tipo de infecção em humanos

(Gauch et al., 2018). A *C. albicans* é a espécie mais relacionada a quadros de infeção, seguida pelas espécies de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Gauch et al., 2008). Além disso, é a espécie mais predominantemente encontrada nas próteses de pacientes com estomatite protética e comumente associada às bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*, em casos de infecção (Wisplinghoff et al., 2005; Shirtliff et al., 2009; Harriott & Noverr, 2011).

A *C. albicans* é um micro-organismo oportunista eucariótico e polimórfico (Peters et al., 2012; Mayer et al., 2013), que na maioria dos indivíduos, habita de maneira comensal diversas áreas do organismo (Mayer et al., 2013; Peters et al., 2013; O'Donnell et al., 2015). Na cavidade bucal estão presentes em 40% a 60% da população (Peters et al., 2010). Entretanto, também são capazes de colonizar vários polímeros utilizados para a confecção de dispositivos médicos e odontológicos, tais como materiais dentário, próteses, implantes, tubos endotraqueais e cateteres (Kojic et al., 2004; Harriot et al., 2009) e formar biofilmes de difíceis erradicação (Harriot et al., 2009; Peters et al., 2010; O'Donnell et al., 2015; O'Donnell et al., 2016). Ribeiro et al. (2012) verificaram a presença de *C. albicans* em 66,7% das próteses totais avaliadas, sendo que 65,5% apresentavam alguma espécie de *Candida*. Paranhos et al. (2013) ao comparar os níveis de biofilme em próteses totais maxilares e mandibulares, de vinte e três usuários de prótese, verificaram que a *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada seguida das espécies de *C. glabrata* e *C. tropicalis*. O'Donnell et al. (2015) identificaram espécies de *Candida* em 72% das próteses dentárias avaliadas, sendo a *C. albicans* a espécie mais predominante.

Os biofilmes de *C. albicans* são mais resistentes ao tratamento antifúngico do que as células planctônicas devido ao padrão de expressão gênica (Ramage et al., 2002; Yeater et al., 2007; Peters et al., 2010). Uma característica desses biofilmes é a heterogeneidade morfológica das células, que resulta em complexa arquitetura tridimensional de biofilme (Chandra et al., 2001). O polimorfismo celular confere a esses micro-organismos a capacidade de se apresentar tanto na forma unicelular (levedura) como na filamentosa (como as hifas ou pseudo-hifas) (Chandra et al., 2001; Sudbery et al., 2004), sendo a forma filamentosa o estado mais patogênico dessa espécie (Chandra et al., 2001; Sudbery et al., 2004; Harriot et al., 2009).

O potencial de virulência desse micro-organismo está relacionado principalmente à flexibilidade fenotípica, produção de enzimas hidrolíticas, aderência, e hidrofobicidade celular (Chandra et al., 2001; Harriot et al., 2009; Peters et al., 2010; Mayer et al., 2013). A produção de enzimas hidrolíticas, especialmente fosfolipase e aspartil-proteinase, é um fator importante para o desenvolvimento da patologia associadas ao fungo (Serda-Kantarcioglu et al., 2002; Saramayake et al., 2006). A fosfolipase é responsável pela invasão da célula hospedeira, rompendo a membrana das células epiteliais permitindo, dessa maneira, a penetração das hifas no citoplasma (Serda-Kantarcioglu et al., 2002; Saramayake et al., 2006) enquanto a aspartil-proteinase digere a superfície das células do hospedeiro e as proteínas da matriz extracelular, além de destruir células do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo dessa maneira, a penetração e colonização do fungo para o desenvolvimento da patogênese (Serda-Kantarciogluet al., 2002; Zago et al., 2015).

A colonização da prótese pela *C. albicans* é o principal fator de risco para o desenvolvimento da estomatite protética, manifestação clínica mais comum das de alterações patológicas associadas à candidíase em usuários de prótese (Arendorf; Walker, 1987; Barbeau et al., 2003; Coelho; Souza; Daré, 2004; Baena-Monroy et al., 2005; Gendreau et al., 2011; Harriott & Noverr 2009; Kossion et al., 2011; Badaró et al., 2017). Estudo recente sugere que o biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* contribui para o desenvolvimento de quadros mais severos de estomatite protética por se tratar de biofilmes mais invasivos e com maior potencial patogênico (Alves et al., 2014).

Evidências sugerem que infecções relacionadas à espécie *C. albicans* são decorrentes de biofilmes multiespécies (Sumi et al., 2002; Hariiot et al., 2009; Morales et al., 2010, Peters et al., 2010), sendo o *Staphylococcus aureus* o terceiro organismo mais comumente isolado em associação com *C. albicans* (Harriot et al., 2009; Peters et al., 2010). O *S. aureus* é a espécie mais patogênica do gênero *Staphylococcus* (Peters et al., 2010); apresenta grande importância clinica, tendo em vista a capacidade de desenvolver mecanismos de resistências às terapias medicamentosas convencionais (Coenye et al., 2008; Peters et al., 2010). A pneumonia aspirativa tem sido considerada uma das mais preocupantes infecções sistêmicas causada pelo *S. aureus,* principalmente em pacientes idosos (Terpenning et al., 2001; Gordon et al., 2008; Peters et al., 2010; Peters et al., 2012). A presença de próteses dentárias tornam os usuários de prótese total mais suscetíveis ao

desenvolvimento dessas infecções (Honna et al., 1994; Coenye et al., 2008; Kart et al., 2014). Estudos indicam que 20 a 30% da população apresenta *S. aureus* como colonizador permanente, enquanto 30% da população como colonizador transitório da cavidade oral (Douglas et al., 2003). Zago et al., (2015), verificaram aparente sinergismo entre as espécie de *C. albicans, S. aureus* suscetíveis à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRS). Os autores observaram também adesão bacteriana predominantemente em hifas.

A associação entre células bacterianas e fúngicas tende a aumentar a tolerância a agentes antimicrobianos (Harriot et al., 2009; Peters et al., 2010; O'Donell et al., 2015; O'Donell. t al., 2016). A *P. aeruginosa* é uma bacteria Gram negativa altamente adaptável (Lambert et al., 2002; Peter et al., 2010) de difícil controle, tanto pelo uso de antibiótico, como por agentes desinfetantes (Lambert et al., 2001; Rumbaugh et al. 2000; Morales et al., 2010; Peters et al., 2010), que contribui para o caráter oportunista desse patógeno (Peters et al., 2010; Lima et al., 2014). Mecanismos de resistência intrínseca (Peter et al., 2010; Morales et al., 2010; Strateva et al., 2011; Lima et al., 2014) e adquirida (Strateva et al., 2011; Lima et al., 2014), associados à produção de fatores de virulência, conferem proteção ao sistema de defesa do hospedeiro, bem como dificultam a difusão dos agentes antimicrobianos (Morales et al 2010;. Strateva et al., 2011).

A adesão de micro-organismos de diferentes potenciais patogênicos associados ao desenvolvimento de estruturas mais complexas com características fenotípicas distintas das células no estado planctônico ressaltam a relevância clínica de protocolos de prevenção e controle do biofilme da prótese, que podem atuar como fontes potenciais de infecção (Powell et al., 1990; Lee et al., 2009; Glass et al., 2010; Ramage et al., 2012; Ribeiro et al., 2012). Embora a literatura reporte diferentes protocolos de higienização para a prótese total (Budtz-Jørgensen, 1979; Abelson, 1981, 1985; Jagger; Harrison, 1995; Nikawa et al., 1999; Shay, 2000; Neppelembroek et al., 2003; Silva-Lovato et al., 2006; Souza et al., 2009), estudos mostram que falta de orientação adequada, características anatômicas das próteses, diminuição da destreza manual e acuidade visual dos pacientes bem como a ineficácia dos higienizadores de prótese (Council on dental materials, instruments and equipment, 1983; Silva-Lovato et al., 2006; Akar et al., 2008) contribuem para a precariedade da saúde oral dos usuários de prótese (Marchini et al., 2006; Dikbas et al., 2006; Catão et al., 2007; Akar et al., 2008; Haumschild et al., 2009; Pace et al.,

2010; Peracini et al., 2010). Axe et al. (2016) relataram que a falta de consenso sobre as recomendações de cuidado e manutenção das próteses entre os profissionais se reflete nos hábitos de higienização dos usuários de prótese.

Os diferentes métodos indicado para remoção e controle do biofilme protético são classificados em: mecânicos (escovação e ultrassom), físicos (energia de micro-ondas), químicos (hipocloritos alcalinos, peróxidos, ácidos, drogas brutas, detergentes e enxaguatórios bucais) e associados (mecânico/físico e químico) (Budtz-Jørgensen, 1979; Abelson, 1981, 1985; Jagger; Harrison, 1995; Nikawa et al., 1999; Shay, 2000; Neppelembroek et al., 2003; Silva-Lovato et al., 2006). Entre os diferentes métodos, o mais frequentemente recomendado, principalmente em países em desenvolvimento, é a escovação com dentifrício (Dill et al., 1988; Kulak-Ozkan et al., 2002; Dikbas et al., 2006; Gedik et al., 2009; Axe et al., 2016). Por outro, lado estudos têm mostrado que a incorporação de ação desinfetante pelos agentes químicos pode atuar como coadjuvante no controle do biofilme (Paranhos, 2007; Nishi, 2011; Nakamoto et al., 1991; Gornistsky et al., 2002; Pavarina et al., 2003; Silva-Lovato et al., 2010; Srinivisan et al. 2010; Dhamande et al., 2012; Ramage et al., 2012; Lucena-Ferreira et al., 2014). Gedik et al. (2009) ressaltam a importância da higienização por meio de agentes químicos para o controle do biofilme. Ramage et al. (2012) concluíram que o uso diário de higienizadores químicos pode diminuir significativamente a adesão de *C. albicans* às bases protéticas.

A imersão em higienizadores efervescentes classificados como soluções à base de peróxidos é comumente recomendada pelos cirurgiões-dentistas pela facilidade do uso (Shay et al., 2000; Dikbas et al., 2006; Iseri et al., 2011; Axe et al., 2016) e eficácia antimicrobiana (Nakamoto et al., 1991; Gornistsky et al., 2002; Pavarina et al., 2003; Silva-Lovato et al., 2010; Srinivisan et al., 2010; Dhamande et al., 2012; Ramage et al., 2012; Ducky et al., 2013; Lucena-Ferreira et al., 2014). Axe et al. (2016) observaram que em países desenvolvidos como Estados Unidos, Japão e Itália, os higienizadores à base de peróxidos foram a primeira recomendação de higiene em 43% dos profisssionais.

Os peróxidos alcalinos são combinações químicas complexas entre componentes oxidantes, efervescentes, redutores de tensão superficial e agentes quelantes (Abelson, 1985). Os diferentes ingredientes ativos presentes, tais como dióxido de titânio, lauril sulfato de sódio e EDTA, parecem influenciar a efetividade antimicrobiana dessas soluções (Sousa et al., 2009; Jose et al., 2010; Pellizzaro et

al., 2012; Dhamande et al., 2012; Kumar et al., 2012; Coimbra et al., 2016). A liberação de múltiplas bolhas de oxigênio exerce ação mecânica de desprendimento entre a superfície da prótese e o biofilme; promovendo assim, a desagregação, dissolução e remoção dos depósitos (Abere, 1979; Abelson, 1981; Silva-Lovato et al., 2010; Srinivisan et al., 2010; Dhamande et al., 2012; Ramage et al., 2012; Lucena-Ferreira et al., 2014; Coimbra et al., 2016).

A grande diversidade desses higienizadores comercialmente disponíveis aliadas à falta de padronização metodológica, influenciam a diversidade de resultados sobre a efetividade desses higienizadores. Embora alguns estudos relatem a ação antimicrobiana dessas soluções em períodos curtos, recomendados pelo fabricante, (Nakamoto et al., 1991; Gornistsky et al., 2002; Pavarina et al., 2003; Coenye et al., 2008; Silva-Lovato et al., 2010; Srinivisan et al., 2010; Dhamande et al., 2012; Ramage et al., 2012; Lucena-Ferreira et al., 2014), outros reportam eficácia da diminuição da carga microbiana em períodos longos, como imersões noturnas (Ramage et al., 2012; Ducky et al., 2013). Entretanto, Coenye et al. (2008) observaram que fatores como tempo, temperatura e volume de água utilizado influenciam a efetividade antimicrobiana desses higienizadores. O aumento do volume de água, assim como do tempo de imersão, para 30 minutos, implicaram no declínio da eficácia dos higienizadores. Além disso, a diminuição da temperatura para 25 ºC influenciou negativamente a atividade antibiofilme. Entretanto, períodos de imersão mais longos (2 h) são relatados como necessários para a eficácia desses higienizadores em materiais reembasadores (Nikawa et al., 1995; Gedik et al., 2009). Por outro lado, estudos ressaltam a importância de seguir as orientações do fabricante para melhor ação dos higienizadores e prevenção de efeitos adversos às bases protéticas (Handa et al., 2008; Ramage et al., 2012).

Um fato importante a considerar é que a maioria dos estudos de avaliação da efetividade dos peróxidos alcalinos foi conduzida frente a biofilmes de única espécie (Nakamoto et al., 1991; Coenye et al., 2008; Ferreira et al., 2009; José et al., 2010; Li et al., 2010; Uludamar et al., 2010; Vieira et al., 2010; Iseri et al., 2011; Lee et al., 2011; Kumar et al., 2012), sendo a *C. albicans* a mais reportada devido à intrínseca relação desse micro-organismo com o desenvolvimento da estomatie protética. Estudos em biofilmes de espécie única são fundamentais como indicadores de perfil de susceptibilidade das espécies frente a esses higienizadores efervescentes. Paranhos et al. (2009) concluíram que a eficácia dos métodos de

higienização depende do tipo de biofilme microbiano formado. Tais achados indicam que o perfil de suscetibilidade dos micro-organismos aos agentes químicos pode contribuir para a seleção de espécies em biofilmes multiespécies (Lucena-Ferreira et al., 2014). Coimbra et al., (2016) ao avaliarem a ação in vitro de soluções à base de peróxidos alcalinos frente a 08 espécies microbianas, relacionadas a doenças locais e sistêmicas encontradas em biofilmes de próteses (*C. albicans, C. glabrata, S. aureus, S. mutans, B. subtilis, E. faecalis, E. coli* e *P. aeruginosa*) verificaram que a susceptibilidade das diferentes espécies pode estar relacionada ao potencial patogênico de cada espécie, bem como às diferenças entre as formulações dos peróxidos alcalinos.

Nesse sentido, a avaliação da eficácia desses higienizadores frente a biofilmes multiespécies torna-se importante. A literatura mostra que os biofilmes multiespécies são menos susceptíveis a agentes antimicrobianos do que os biofilmes mono espécies (Hoffman et al. 2006; Biswas et al. 2009; Harriott & Noverr 2009, 2010; Simoes et al. 2010; Peters et al., 2013). Alguns estudos sobre a susceptibilidades dos biofilmes multiespécies a agentes desinfetantes (Simoes et al., 2010; Peter et al., 2013; Kart et al., 2017) e higienizadores de próteses (Lucena et al., 2014; Panariello et al., 2016; Vasconcelos et al., 2017) têm sido realizados; no entanto, dúvidas ainda permanecem em relação à efetividade antimicrobiana dos higienizadores à base de peróxidos frente à associação entre fungos e bactérias.

Simões et al. (2010) verificaram que biofilme multiespécies apresentou maior resistência ao hipoclorito de sódio (0,1 mg/L), quando comparado ao biofilme mono espécie. Entretanto, na ausência da bactéria *A. calcoaceticus,* o biofilme multiespécies foi mais suscetível ao hipoclorito de sódio do que o mono espécie. Peters et al. (2013) encontraram diferenças na suscetibilidade entre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* quando comparados a biofilmes mono e multiespécies. Lucena-Ferreira et al. (2014) observaram diminuição do número de bactérias e aumento do número de *C. albicans* após utilização diária do higienizador Polident em biofilme de múltiplas espécies formado por cinco bactérias (*Actinomyces naeslundii, Veillonella dispar, Fusobacterium nucleatum,Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*) e uma levedura (*C. albicans*). Paraniello et al. (2016) verificaram que a escovação combinada com agentes químicos para imersão da prótese propiciou maior remoção do biofilme multiespécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. Kart et al., (2017) observaram que a magnitude da eficácia do

desinfetante em biofilme multiespécies depende tanto, das cepas presentes, como do desinfetante avaliado. Os autores verificaram que, embora no biofilme multiespécies de *C. albicans, S. aureus* e *P. aeruginosa*, *o Staphylococcus* apresentou maior susceptibilidade à clorexidina. Não foram encontradas diferenças significativas dessa espécie em relação aos outros desinfetantes quando comparados biofilmes mono e multiespécies. Vasconcellos (2017), ao avaliar a efetividade antimicrobiana de oito higienizadores de prótese a base de peróxidos sobre o biofilme multiespécies de *S. mutans, S. aureus, C. albicans* e *C. glabrata,* em espécies mistas de resina e metal, verificou que somente o higienizador NitrAdine apresentou alguma ação antimicrobiana significativa; e esta somente em relação a *S. mutans*.

Considerando que alterações nas condições ambientais podem induzir mudanças na arquitetura do biofilme, na biomassa e na composição da matriz extraceluar, a exposição aos agentes oxidativos pode, portanto, levar à formação de biofilmes mais reistentes à ação dos agentes antimicrobianos (Kart et al., 2014; Lucena-Ferreira et al., 2014; Zago et al., 2015). Nesse sentido, e com base em vasta revisão de literatura, novos estudos devem ser realizados para avaliar o perfil de susceptibilidade dos micro-organismos quando associados e o potencial antimicrobiano dos peróxidos frente a biofilme multiespécies. Este é um fator importante, considerando a grande aceitação desse tipo de higienizador devido a facilidade de uso, principalmente em casos de idosos dependentes, imunocomprometidos e pacientes com maior debilidade e dependência funcional, que são mais vulneráveis ao desenvolvimento de quadros infecciosos e, portanto, necessitam de maior atenção na implementação de métodos rotineiros de higienização das próteses (El-Soh et al., 2011; Gúzman et al., 2012; Axe et al., 2016; O'Donnell et al., 2016). Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a efetividade antimicrobiana de higienizadores à base de peróxidos frente a biofilme multiespécies, de *C. albicans*, *P.aeruginsa* e *S. aurues,* e o impacto dessas soluções na redução da carga microbiana, na atividade metabólica e no biofilme agregado, mediante as interações fungo-bactérias.

As hipóteses nulas deste estudo foram que os higienizadores à base de peróxido não influenciariam tanto a viabilidade dos micro-organismos, mediante as associações entre fungos-bactérias como também a atividade metabólica e a viabilidade do biofilme multiespécie

# 2. Proposição

## 2. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar:

1) A efetividade antimicrobiana de higienizadores de prótese à base de peróxidos sobre biofilme multiespécies de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aurues*, por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Os objetivos específicos do presente estudo foram avaliar:

1) O perfil de suscetibilidade das espécies de *C. albicans, P. aeruginosa* e *S. aureus* aos higienizadores à base de peróxidos, quando associadas em biofilmes multiespécies, por meio redução da carga microbiana, em Unidades Formadoras de Colônias (UFC);
2) O perfil de suscetibilidade do biofilme multiespécies de *C. albicans, P. aeruginosa* e *S. aureus* aos tratamentos higienizadores à base de peróxidos alcalinos, por meio da avaliação da atividade metabólica do biofilme (Ensaios XTT);
3) A viabilidade celular do biofilme multiespécies de *C. albicans, P. aeruginosa* e *S. aureus,* por meio de Microscopia de Epifluorescência.

# 3. Material e Métodos

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

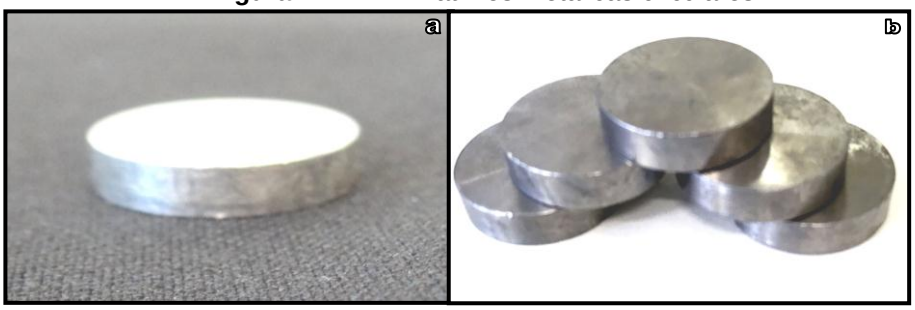
## 3.1 Delineamento Experimental

Para verificar a efetividade antimicrobiana das soluções higienizadoras na redução da carga microbiana, da atividade metabólica e na viabilidade do biofilme multiespécies, foram definidos os fatores de variação. Para a avaliação do impacto na carga microbiana do biofilme multiespécies foram considerados fatores de variação as cepas (3 níveis - C. *albicans, S. aureus* e *P. aeruginosa*) e as soluções higienizadoras (3 níveis – PBS, NitrAdine e o Fixodent). Dessa maneira, foram utilizados 27 corpos de prova (n=9). Para a avaliação do impacto das soluções higienizadoras na atividade metabólica (n=9) e na viabilidade (n=2) do biofilme multiespécies foram considerados como fatores de variação às soluções higienizadoras (3 níveis – PBS, NitrAdine e o Fixodent), sendo utilizado 33 corpos de prova. Para a confirmação da esterelidade foram empregados 15 corpos de prova. Dessa forma, a amostra do experimento foi composta por 75 corpos de prova.

## 3.2 Confecção dos Corpos de Prova

Os corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável (Clássico Ltda, São Paulo, SP, Brasil), foram confeccionados a partir de moldes em gesso. Os moldes foram obtidos a partir de matriz metálica circular (15 mm x 3 mm) (figura 1) incluídos em muflas metálicas (Jon; Jon Indústria Brasileira, São Paulo, SP, Brasil) .

**Figura 1. A – B:** Matrizes metálicas circulares




Para a inclusão das matrizes nas muflas (figura 2), inicialmente uma camada de gesso pedra Tipo III (Gesso Rio; Orlando Antônio Bussioli ME, Rio Claro, SP, Brasil), foi manipulado mecanicamente na proporção de 30 mL de água para cada 100 g de pó. Cada matriz foi isolada com uma fina camada de vaselina e então distribuído sobre a camada de gesso. A seguir a contra mufla foi posicionada e a inclusão das matrizes foi finalizada com gesso pedra Tipo III.

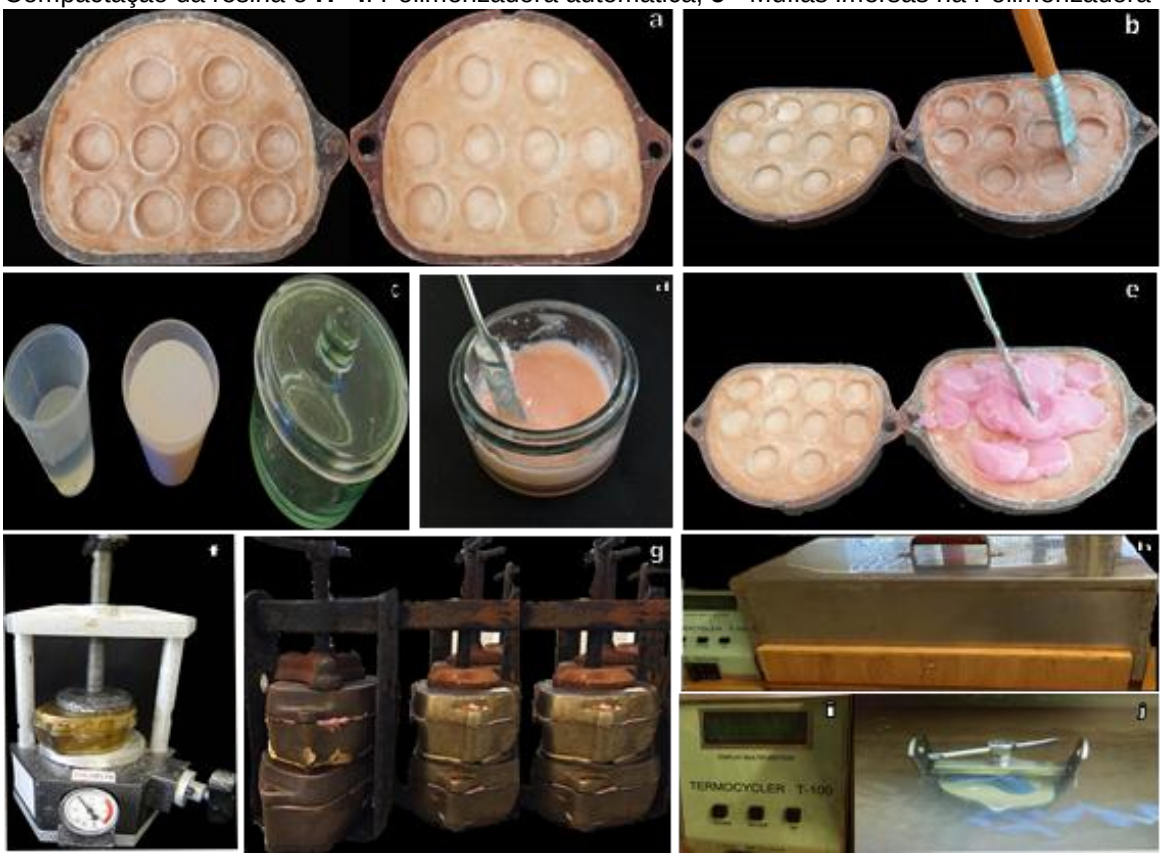
**Figura 2.** Matrizes inclusas em mufla

### 3.2.1 Prensagem

Após a presa do gesso, as muflas foram separadas, as matrizes metálicas removidas (figura 3A) e o gesso, isolado (Cel-Lac, SS White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (figura 3B). A resina acrílica foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante (proporção pó e líquido: 21 g para 7 mL) (figura 3 C-D), e inserida na fase plástica, nos moldes (figura 3E). Em seguida, as muflas foram levadas a prensa hidráulica (Protecni - Protecni Equip. Med., Araraquara, SP, Brasil) para compactação com carga de 1200 kgf, durante 30 minutos (figura 3F).

A polimerização foi realizada pelo método convencional (banho de água) em polimerizadora automática (Termocicler 100 - Oficina de Precisão, Campus da USP de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil), com imersão em água a 73 ºC por 90 minutos, seguido por estágio de fervura por 30 minutos (figura 3 G-H).

**Figura 3. A** – Moldes das matrizes prontos; **B** - Isolamento dos Moldes; **C** – Proporção da Resina Acrílica; **D** - Manipulação da Resina Acrílica; **E** – Inserção da resina na mufla; **F – G**: Compactação da resina e **H - I**: Polimerizadora automática; **J** - Muflas imersas na Polimerizadora




### 3.2.2 Desinclusão e Acabamento

Após resfriamento da mufla em temperatura ambiente e demuflagem dos corpos de prova, estes foram imersos em água destilada e mantidos em estufa (Odontobrás Ind. e Com. Equip. Med. Odont. Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil), durante 24 horas a 50 °C, para eliminação do monômero residual.

Os corpos de prova receberam acabamento com fresa multilaminada (Mini-cut; Malleifer AS, Ballaiguer, Suíça) (figuras 4), em micromotor de baixa rotação (Dabi Atlanti, Ribeirão Preto,SP, Brasil), para remoção dos excessos.

**Figura 4. A –** Corpos de prova com e sem acabamento; **B -** Acabamento dos corpos de prova; **C –** Corpo de prova após acabamento

### 3.2.3 Padronização da Rugosidade

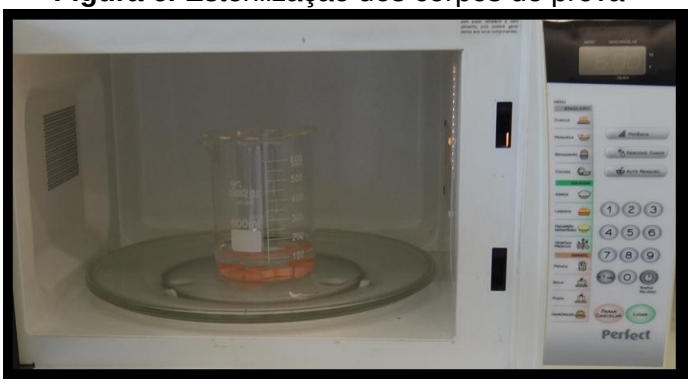
A rugosidade superficial (Surftest SJ-201P; Mitutoyo Corporation, Tokyo, Japan) (figura 5 A) de cada corpo de prova foi padronizada entre 2,7 e 3,7 µm (Zissis et al, 2000; Panariello et al., 2016) por meio de lixa d'água nº 150 (Norton Indústria Brasileira, São Paulo, SP, Brasil). Para cada lado do corpo de prova foram realizadas três leituras. O valor de Ra (µm) foi calculado como a média das leituras obtidas.

**Figura 5.** Verificação da rugosidade

### 3.2.4 Esterilização dos corpos de prova

Os corpos de prova foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 10, colocados em Béquer com 150 mL de água destilada e submetidos à esterilização em micro-ondas (Panasonic Perfect, 127 V; 800 W; 2450 MHz), na potência 8 e tempo de exposição de 6 minutos (Neppelenbroek, 2005; Salles et al., 2015) (figura 6).

**Figura 6.** Esterilização dos corpos de prova




### 3.3 Soluções Higienizadoras

A fim de garantir reprodutibilidade, todas as etapas a seguir foram conduzidas em triplicata, em três momentos distintos. Dessa forma, o biofilme foi

cultivado em 03 corpos de prova, para cada grupo experimental, em três semanas sequentes.

Para a avaliação da efetividade antimicrobiana dos peróxidos frente a biofilme multiespécies foram empregados dois higienizadores à base de peróxidos (tabela 1) (figura 7).

**Tabela 1.** Higienizadores empregados

| Higienizadores | Fabricante | Composição |
|---|---|---|
| **NitrAdine Medical Interporous (MI)** | MST Laboratories AG, Vaduz, Liechtenstein | Ácido Cítrico, Lauril sulfato de sódio, Lactose monohidratada, Bicarbonato de sódio, Cloreto de Sódio, Monopersulfate de potássio de higrogenio. |
| **Fixodent Advanced Whitenning (FX)** | Procter e Gamble CoCincinnati/ Ohio/USA | Monopersulfato de potássio; Carbonato de sódio; Perborato de sódio; Ácido Cítrico, TAED; Copolímero de dimeticona, Cetil dimeticona-copoliol; Copolímero dimeticona Sorbitol; Lauril Sulfoacetato de sódio; EDTA tetrassódio, amido de milho modificado e celulose. |

**Figura 7.** Higienizadores empregados

### 3.3.1 Avaliação do pH dos higienizadores

O pH das soluções higienizadoras foi aferido utilizando pHmetro de bancada (PHS-EE, PHTEK, Curitiba, PR, Brasil). As leituras foram feitas durante o tempo de imersão recomendado pelo fabricante em temperatura morna (37º $\pm$ 2º C). A cada leitura de pH o eletrodo foi lavado abundantemente com água deionizada e seca com gaze estéril.

## 3.4 Biofilme

Como revelador/indicador da eficácia dos higienizadores frente a biofilmes multiespécies, foram utilizadas três cepas microbianas (tabela 2), comumente

encontradas na boca e em próteses dentárias e frequentemente associadas (Peter et al., 2010; Kart et al., 2014; Donell et al., 2016). As cepas foram obtidas da coleção do Laboratório de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Toda a manipulação, envolvendo as cepas, foi feita em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, SP, Brasil) asséptica.

**Tabela 2.** Cepas microbianas empregadas

| Micro-organismos | Identificação | Características Morfotintoriais |
|---|---|---|
| *Candida albicans* (Ca) | ATCC 10231 | Leveduras |
| *Staphylococcus aureus* (Sa) | ATCC 25923 | Cocos gram-positivos |
| *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) | ATCC 27853 | Bacilos gram-negativos |

### 3.4.1 Preparação do Inóculo

Para o preparo do inóculo, os micro-organismos *C. albicans, S.aureus e P.aeruginosa* foram descongelados e semeados individualmente em placa de Petri contendo meio de cultura Agar *Brain Heart Infusion* (BHI) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia) e incubadas a 37 °C durante 24 horas (figura 8 A-D). Após esse período uma colônia de cada espécie foi transferida, por meio de uma alça microbiológica, para o caldo de cultura *Brain Heart Infusion* (BHIB) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia) (figura 8 E-I) e cultivada durante o período de 16 a 20 horas a 37ºC (figura 8J), a fim de obter células em fase de crescimento exponencial. Após a incubação as células foram centrifugadas a 4.000 g por 5 minutos (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha. Modelo: 5810R) (figura 8 L-M) e lavadas duas vezes com solução *Phosphate buffered saline* (PBS) estéril. As células lavadas foram ressuspensas em PBS e a concentração celular foi padronizada.

A concentração de $10^6$ UFC/mL de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi padronizada, individualmente, pela leitura da absorbância de 0,08 e 0,120, respectivamente, a 625nm por meio de espectofotometria (Multiskan GO, Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, MA, EUA) (Leite et al., 2014) (figura 8N).

A determinação da concentração de *C. albicans* foi realizada por meio de contagem em câmara de Neubauer (HBG, Gießen, Germany), para maior precisão, devido à morfologia variável do gênero. A câmara de Neubauer contém uma lâmina grossa para uso em microscópio ótico, uma depressão no centro e duas câmaras, com linhas perpendiculares dividindo essas câmaras em quadrantes. Cada

quadrante é destinado à contagem de células, por unidade de volume de uma suspensão. O quadrante de maior divisão é destinado às células maiores, onde se realiza a contagem das leveduras. O volume de cada quadrante é 0,0001 mL. Sendo assim, a contagem de células torna-se viável.

A contagem foi realizada a partir de 10 µL de suspensão da levedura observados ao microscópio ótico (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Jena, Germany). Após obtenção do número total nos 4 quadrantes periféricos, o cálculo da concentração de *C. albicans* (por mL) foi feito da seguinte forma:

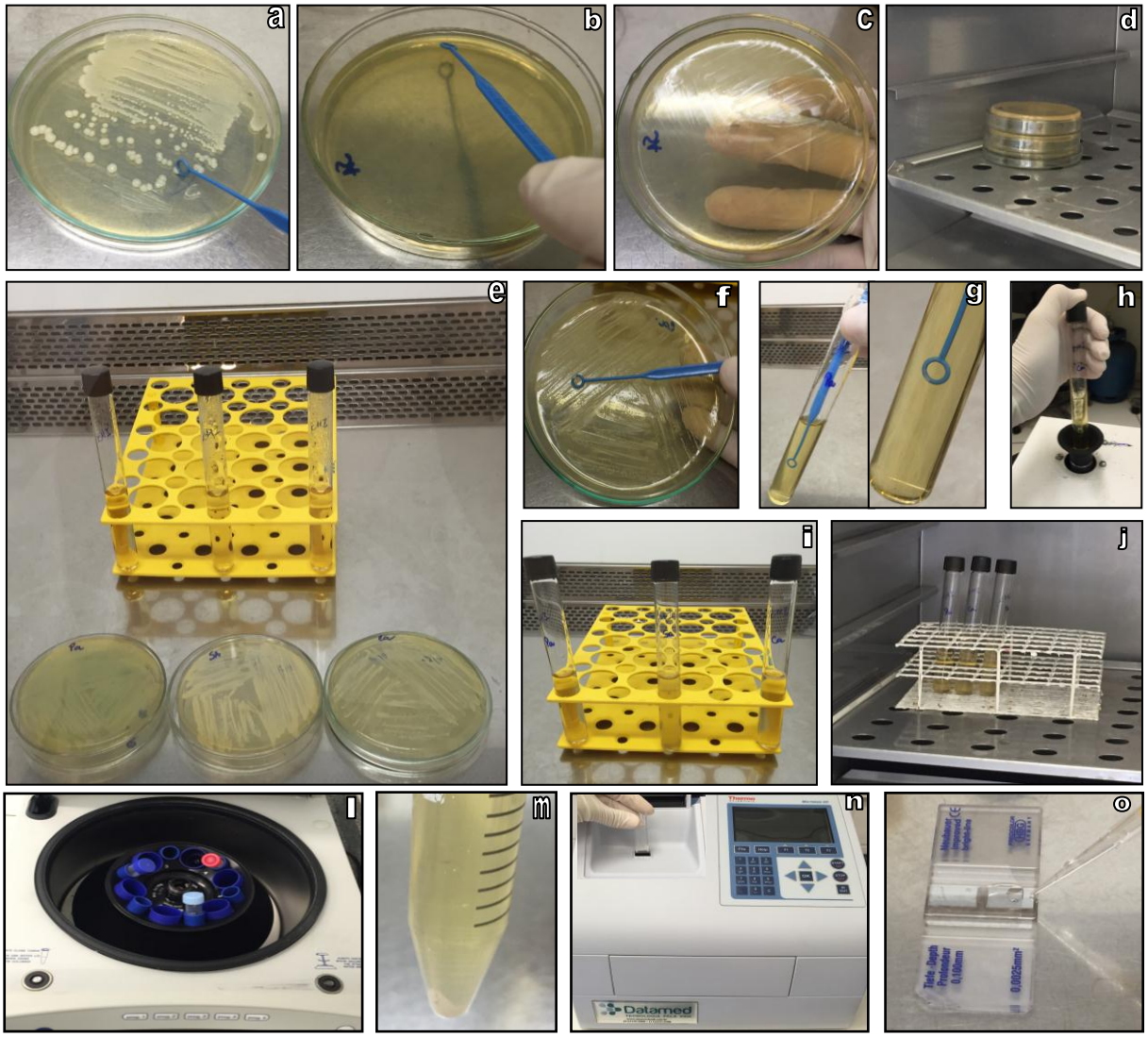
$$N = \frac{C}{4} \times 10^4 \times D$$

**,** sendo:

**N**: número total de células
**C**: contagem de células nos 4 quadrantes periféricos
**D**: diluição utilizada

A inoculação do meio foi realizada com a padronização da concentração de $10^5$ células/mL de *C. albicans*. Para confirmação da concentração celular, alíquotas de todos os micro-organismos foram semeadas em placas de Petri e incubadas para posterior contagem das colônias.

**Figura 8. A** – Coleta de Micro-organismo; **B**- Semeadura no meio BHI; **C** – Placa de Petri após a semeadura da colônia; **D**- Incubação das placas em estufa; **E**– Placas com as colônias e o meio de cultura para o preparo do inóculo; **F – G** : Coleta da colônia e inoculação do meio, **H**: Agitação do meio contaminado, **I** - Meios contaminados; **J** – Meios inoculados na estufa ; **L** - Centrifugação dos meios ; **M** – Meio após a centrifugação ; **N** – Amostra para a leitura de absorbância; **O** – Colocação do Inóculo em Câmera de Neubauer



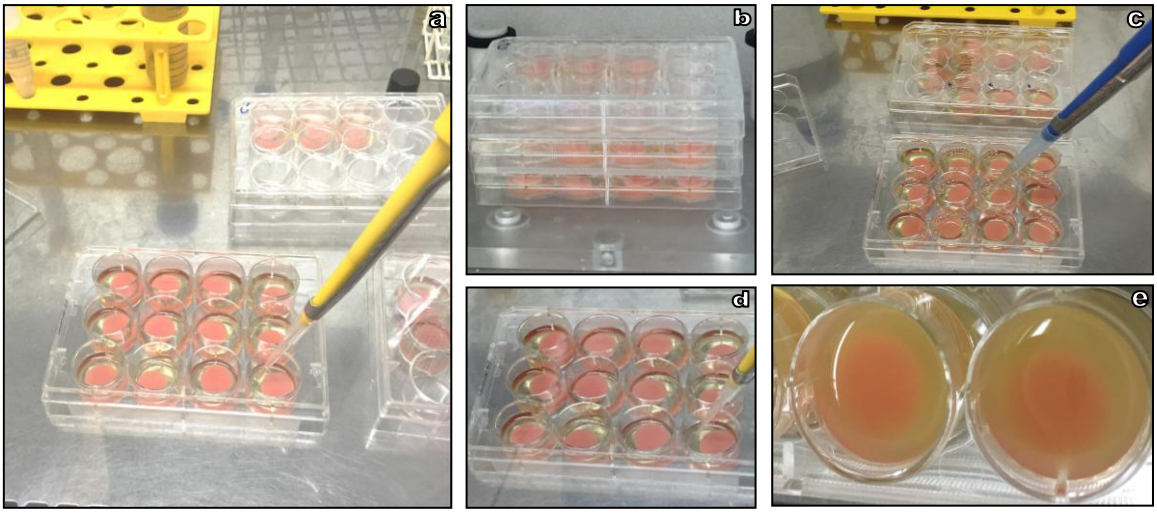

### 3.4.2 Desenvolvimento do Biofilme Multiespécies

O biofilme multiespécies foi formado em placas de cultura pré-estéreis de 12 poços (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) de acordo com a metodologia descrita por Kart et al. (2014). Primeiramente, os corpos de prova foram distribuídos aleatoriamente e individualmente nos poços. A seguir, receberam 2mL de BHIB suplementado com 5% albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint. Lois, Missouri, EUA) e inoculado com $10^6$ UFC/mL de S. *aurues*, $10^6$ UFC/mL de *P. aeruginosa* e $10^5$ UFC/mL *C. albicans* (figura 9A). As placas foram incubadas por 4 h a 37 °C sob agitação de 75 rpm, em estufa bacteriológica (Incubadora Shaker,

Mod. CE-320, CienLab, Campinas, SP, Brasil), para a aderência dos micro-organismos aos corpos de prova (figura 9B).

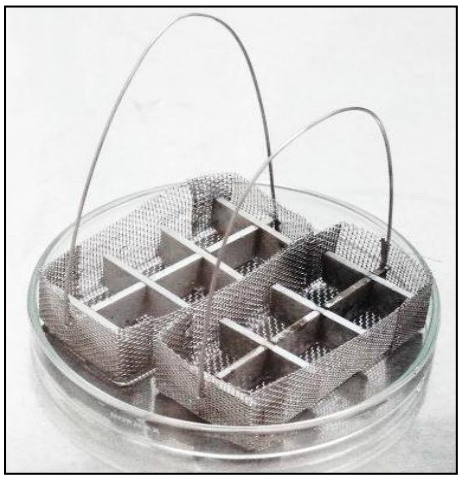
Após a fase de aderência, cada corpo de prova foi cuidadosamente removido e lavado, duas vezes, por inserção suave em novos poços contendo 2 mL de PBS estéril, a fim de remover os micro-organismos não aderidos e os metabólitos (figura 9 C-D) gerados. Em seguida, 2mL de BHIB estéril suplementado com 5% de BSA foram adicionados a cada poço, com o objetivo de fornecer nutrientes para o crescimento e maturação do biofilme. As placas foram novamente incubadas a 37°C sob agitação, durante 20 horas (figura 9E).

**Figura 9. A** – Contaminação dos corpos de prova; **B** – Placas com os corpos de prova contaminados na estufa; **C** – Lavagem dos corpos de prova após fase de aderência; **D**- Colocação de meio de cultura para a maturação do biofilme; **E**– Biofilme após 20 horas na estufa




Decorrido o tempo de maturação, os corpos de prova foram levados à câmera de fluxo laminar, onde foram retirados das placas e transferidos para uma cesta de aço inoxidável estéril (6 mm comprimento x 3 mm de largura e 2 mm de altura), com 6 repartições de 2,0 x 1,5mm (figura 10), por meio de uma pinça estéril, para a realização do protocolo de higienização (Paranhos et al., 2009).

**Figura 10.** Cesta de aço inoxidável com repartições

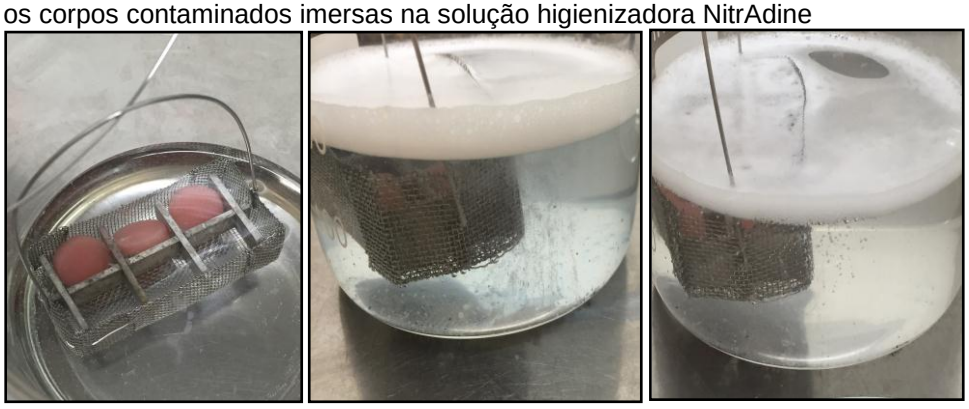


### 3.5 Imersão nas soluções higienizadoras

Para cada cesta contendo os corpos de prova foram adicionados os higienizadores a serem testados, seguindo as recomendações de cada fabricante (figura 11 A-C). Os corpos de prova foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos (n=3):

1) **Grupo CP** (Controle positivo): PBS estéril em temperatura ambiente (23 ± 2 ºC), por 15 minutos;
2) **Grupo MI**: 150 mL de água destilada esterilizada (morna: 37 ± 2 ºC) e 01 pastilha efervescente do higienizador NitrAdine, por 15 minutos;
3) **Grupo FX** : 150 mL de água destilada esterilizada (morna: 37 ± 2 ºC) e 01 pastilha efervescente do higienizador Fixodent Advanced Whitening, por 15 minutos.

**Figura 11. A** – Cesta com corpos de prova imersa em PBS; **B** – Cesta com os corpos contaminados imersas na solução higienizadora Fixodent; **C** – Cesta com os corpos contaminados imersas na solução higienizadora NitrAdine



Decorrido o período de imersão, foi realizada a lavagem dos corpos de prova transferindo as cestas para outros béqueres com 150 mL de água destilada por 5 minutos. A seguir, os corpos de prova foram enxaguados com água destilada estéril por mais três vezes sequenciais, com o objetivo de remover possíveis resquícios das soluções higienizadoras utilizadas.

### 3.6 Unidades Formadoras de Colônias

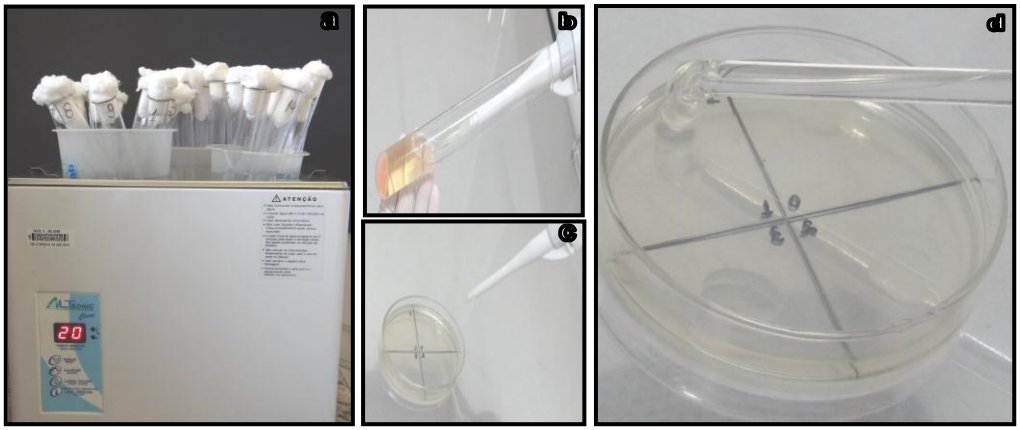
Após o enxague, cada corpo de prova foi então, transferido para um tubo de ensaio de vidro contendo 10 mL de caldo *Letheen* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia), para avaliação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). Os tubos de ensaio contendo o corpo de prova foram mantidos por 10 minutos em cuba de ultrassom (Altsonic, Clean 9CA, Ribeirão Preto, SP, Brasil) a 40 KHz e 200 W, visando o desprendimento das células microbianas residuais (figura 12 A).

Em seguida, para a semeadura, cada tubo de ensaio foi individualmente agitado em agitador mecânico (Phoenix® – AP56, Ind. E Com. de Equip. Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil), durante 15 segundos e uma alíquota de 25 µL da suspensão foi semeada (10º) em placa de Petri, contendo os meios de cultura específicos (tabela 3, Apêndice I) (figura 12 B-C). Em seguida, outra alíquota de 25 µL da suspensão foi transferida para um microtubo (Axigen, Corning, Nova York, EUA) contendo 225 µL de PBS para a obtenção da diluição $10^{-1}$. A partir desta diluição obteve-se as outras diluições seriadas de $10^{-2}$ e $10^{-3}$. Cada diluição foi transferida à placa de Petri, nos respectivos quadrantes, e espalhada com auxílio de uma alça Drigalski (figura 12 D). Ao final, as placas foram incubadas durante 24 a 48 horas a 37 °C.

**Tabela 3.** Meios de cultura específicos empregados para cada cepa microbiana

| Micro-organismos | Meios de cultura específicos |
|---|---|
| *C. albicans* (Ca) | CHROMagar Candida (Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan USA) |
| *S. aureus* (Sa) | Manitol Salt Agar (Kasvi, Padua,Veneto, Itália) |
| *P. aeruginosa (Pa)* | Agar Cetrimide (Acumedia, Lamsing, Michigan USA) |

**Figura 12. A** – Tubos contendo os corpos de prova no ultrassom; **B** – Tubo de ensaio após agitação para a coleta da alíquotas para a semeadura; **C** – Alíquotas preferentes a cada diluição; **D** – Semeadura de cada diluição.




Depois do período de incubação, com o auxílio de uma lupa estereoscópica (Nikon, Modelo 86786, Tókio, Japão), o número de colônias de cada placa foi contado. Para o cálculo das UFC/mL para cada micro-organismo analisado, foi considerada a diluição em que o número de UFC variou entre 1 e 300 colônias, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{nº de colônias} \times 10^{n}}{q}$$

, sendo:

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

Após finalizarem as semeaduras, os tubos de ensaios contendo os corpos de prova foram mantidos incubados a 37 ºC por até 14 dias para avaliação da esterilidade.

### 3.7 Atividade metabólica do biofilme

Para a avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos após a imersão nas soluções higienizadoras foi realizado o ensaio de redução do sal de tetrazólio XTT [*2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida*] (Sigma-Aldrich), segundo o protocolo utilizado por Silva *et al.* (2008).

Este ensaio é baseado na habilidade de enzimas metabolicamente ativas converterem o XTT (cor amarela) em Formazan (cor laranja), o qual posteriormente é mensurado em espectrofotômetro.

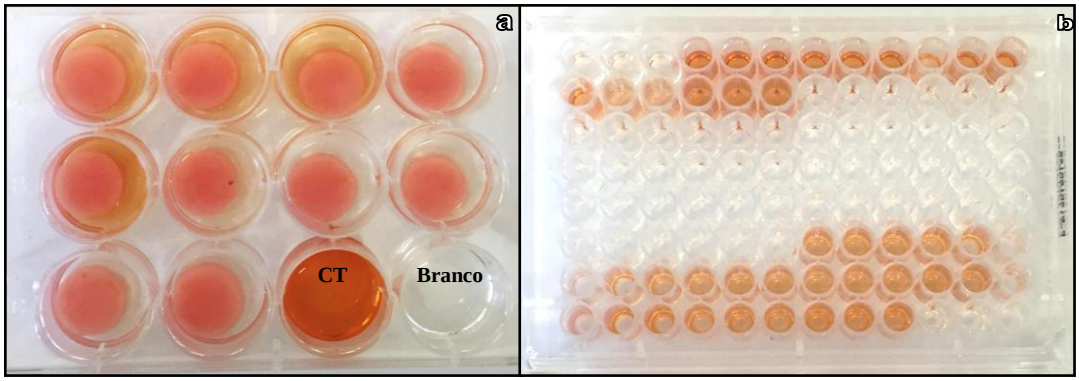
Inicialmente, o XTT foi dissolvido em solução de PBS a uma concentração final de 1 mg/mL. A solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm (SartoriusStedimBiotech, Gottingen, German) e armazenada em refrigerador a -70 ºC até o uso. A solução de Menadiona (Sigma-Aldrich) foi preparada à concentração de 0,4 mM, em acetona, imediatamente antes de cada ensaio. Para cada ensaio, a solução de XTT foi descongelada e misturada com a solução de Menadiona a uma razão de volume de 20:1.

Após formação do biofilme e aplicação dos protocolos de higienização, conforme descrito anteriormente, três corpos de prova de cada grupo experimental foram transferidos a uma nova placa de cultura de 12 poços. Em seguida, 948 µL de PBS suplementado com 100mM de glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 240 µL de XTT e 12 µL de Menadiona foram adicionados a cada poço. As placas, então, foram cobertas com folha de alumínio e incubadas na ausência de luz a 37 °C durante 2 horas.

Decorrido o tempo de incubação 100 µL do produto da degradação do XTT (sobrenadante) (figura 13A) foi transferido para placas de 96 poços (figura 13B). A quantificação foi feita em triplicata, por meio de espectrofotometria a 492 nm, utilizando um leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientifc, Waltham, MA, EUA). Conforme descrito anteriormente, esta etapa foi realizada em triplicata, em três momentos diferentes.

As médias das alterações colorimétricas (em Unidades de Absorbância) foram registradas. Cada placa possuia 03 poços “branco” (PBS com glicose + XTT + Menadiona), representando “o valor zero” para as quantificações. Desta maneira, a média dessas leituras foi subtraída das médias das leituras experimentais. A fim de averiguar a reação de redução do XTT, um controle positivo (CT) contendo $10^8$ UFC/mL de *Candida albicans*, foi conduzido simultaneamente.

**Figura 13. A** – Produto de degradação do XTT após a incubação da placa; **B** – Placa de micro titulação para leitura em espectrofotômetro



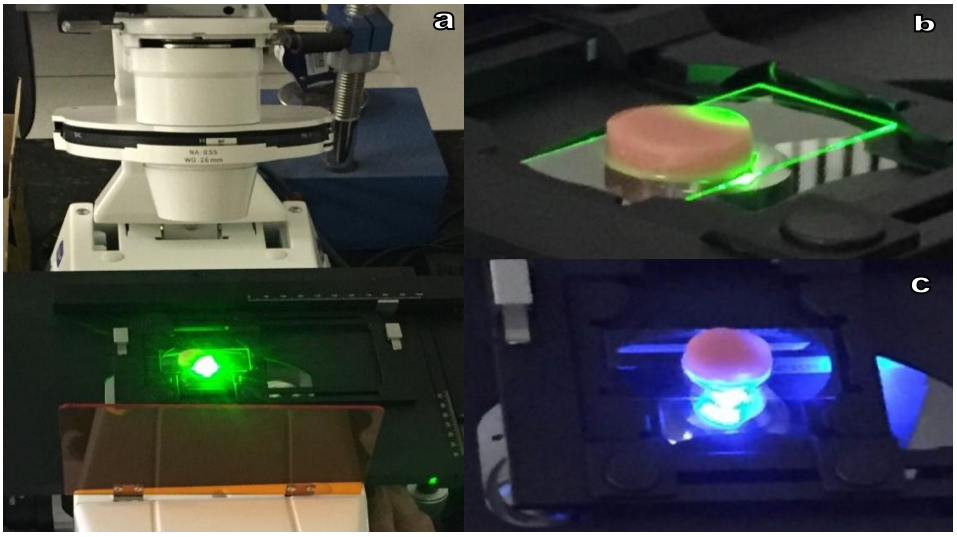

### 3.8 Viabilidade do Biofilme

A microscopia de epifluorescência baseia-se na excitação de moléculas com radiação de baixo comprimento de onda, resultando na emissão de radiação de maior comprimento de onda (Webb et al., 2013). Para identificação das células vivas e mortas nas superfícies dos corpos de prova, foi utilizado o kit Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, Eugene, OR, USA), contendo corantes específicos com propriedades fluorescentes.

Após formação do biofilme e aplicação dos protocolos de higienização, conforme descrito anteriormente, 2 corpos de prova de cada grupo experimental foram transferidos a uma nova placa de cultura de 12 poços. Para o preparo do corante, foram adicionados 2,5 µL da solução do componente A (Syto 9 – verde) e 2,5 µL da solução do componente B (Iodeto de propídeo – vermelho) a 15 mL de PBS. Em seguida, sobre a superfície do corpo de prova foram adicionados 1,5 mL dessa mistura. Os corpos de prova foram então incubados em ambiente protegido de luz e a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Decorrido o tempo de incubação, os corpos de prova foram lavados com PBS por 1 minuto e observados em Microscópio de Fluorescência (Axioskop II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) (figura 14A) com filtros apropriados, ou seja, o FITC para evidenciação de todas as células presente no biofilme (em verde) (figura 14B) e o RHOD para evidenciação das células mortas (em vermelho) (figura 14C).

**Figura 14.** **A –** Microscópio de Epifluorescência; **B –** Posicionamento do corpo de prova com o filtro FITC; **C –** Posicionamento do corpo de prova com o filtro RHOH




Foram avaliados 10 campos para cada corpo de prova (n=2), sendo duas imagens para cada campo observado (01 verde e 01 vermelho), totalizando então, 40 imagens de cada situação experimental.

A quantificação foi realizada a partir do cálculo do número de pixels, conforme descrito por Mesquita et al. (2011) e Dias et al. (2013) (fluxograma 1). Inicialmente, as imagens originais, foram tratadas utilizando o *software Adobe Photoshop* (versão 14 64-bit) a fim de reduzir o *background* e as sombras. Em seguida, as imagens foram convertidas em imagens limpas em formato binário (preto e branco) em que o branco representa a área marcada pelo corante por meio do *software ImageJ* 1.45s para calcular a área da região corada (verde ou vermelho) e a área total da imagem (figura 15 A-I).

**Fluxograma 1**. Análise das Imagens da Microscopia de Epifluorescência

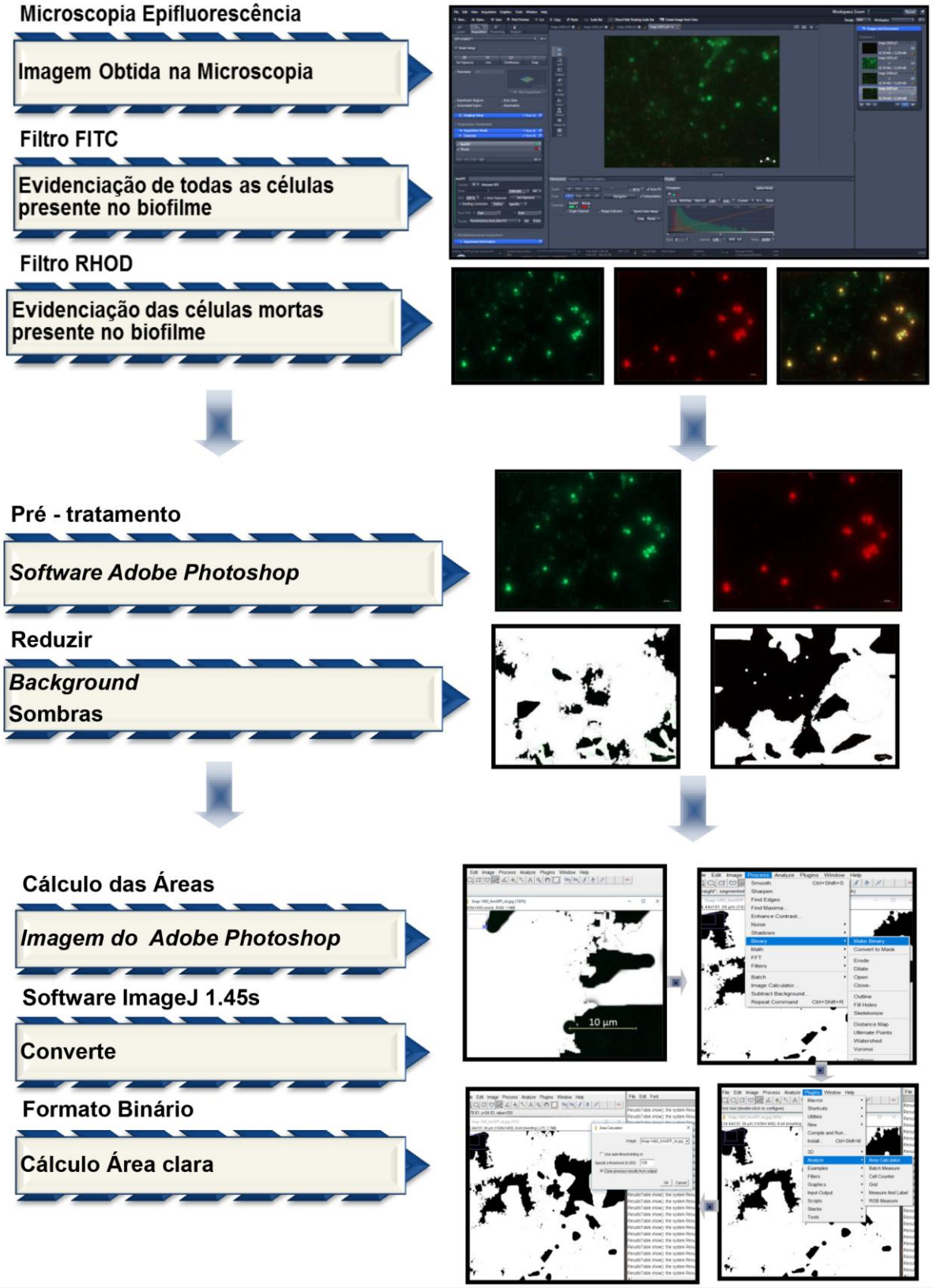
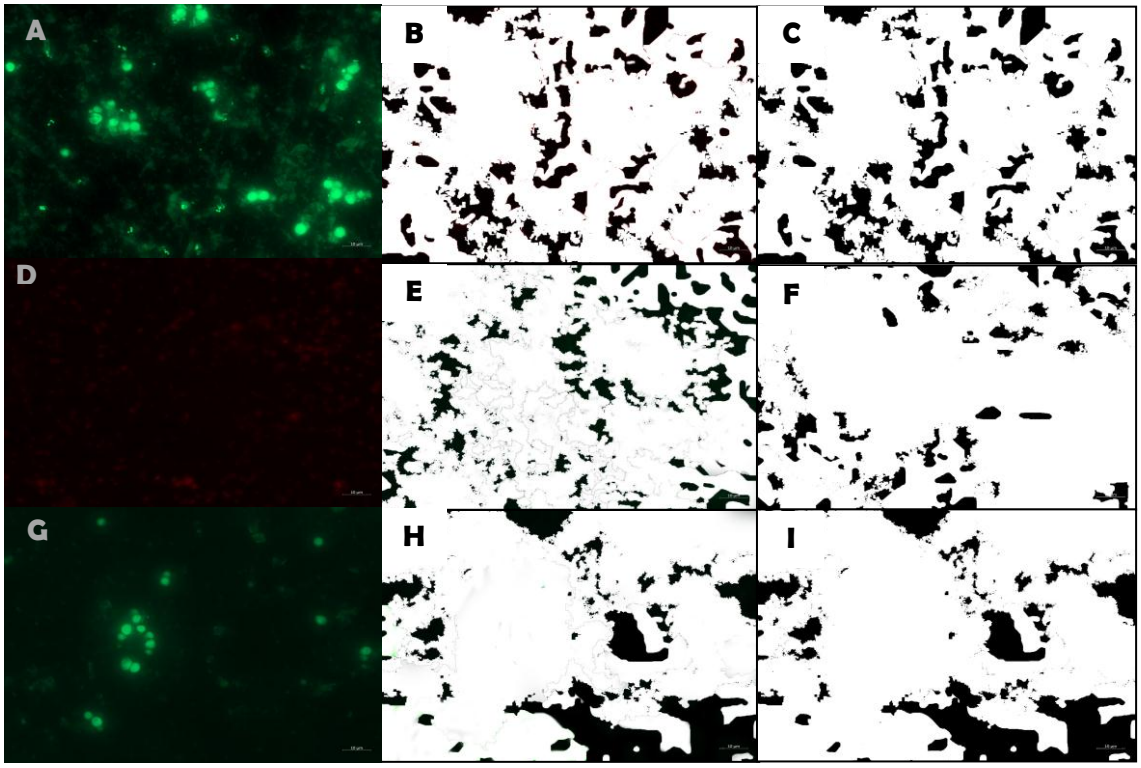


**Figura 15.** Sequencia da análise das áreas do Biofilme: **A, D e G** – Imagens obtidas pela microscopia; **B, E e H** – Imagens Software AdobePhotoShop e **C, F e I** – Conversão em Imagens Binárias pela *ImageJ*




A partir da quantificação das fotos originalmente marcadas em verde foi calculado o biofilme total aderido ao corpo de prova (%). E para o cálculo do percentual de células vivas no biofilme aderido ao corpo de prova, as células mortas (marcadas em vermelho) foram subtraídas do biofilme total, seguindo as seguintes fórmulas:

$$\text{Área}_{\text{TOTAL}}\ (\%) = \frac{\text{ÁREA CLARA}}{\text{ÁREA TOTAL}} \times 100$$

$$\text{Área}_{\text{VIVA}}\ (\%) = \frac{\text{Área clara}_{\text{(FOTO VERDE)}} - \text{Área clara}_{\text{(FOTO VERMELHA)}}}{\text{Área Total}} \times 100$$

### 3.9 Análise Estatística

Por se tratar de variáveis contínuas, os dados do parâmetro microbiológico (incidência das espécies) obtido em relação ao tipo de solução higienizadora utilizada foram submetidos à análise de normalidade e homogeneidade para definição da análise estatística pertinente. Para tanto, foi utilizado o software IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corp Armonk, NY, EUA).

Os valores de UFC/mL foram transformados de acordo com a fórmula $\log_{10}$(UFC/mL+1). Verificada a distribuição não normal dos dados (Teste de Shapiro-Wilk) para as variáveis de UFC/mL, Unidades de Absorbância e Percentual de Área, empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($\alpha$=0,05). Para comparação entre os dados vinculados (Percentual de área de células vivas e totais) empregou-se também o teste não paramétrico de Wilcoxon.

O teste de Anova e pós-teste de Tukey foi empregado para a análise da variável de UFC/mL para *C. albicans*, uma vez que apresentaram distribuição normal.

# 4. Resultados

# 4 RESULTADOS

## 4.1 Análise de esterilidade

A Tabela 4 apresenta os resultados da turvação dos meios de cultura dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após a imersão nas soluções higienizadoras e posterior incubação.

**Tabela 4.** Turvação dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após a imersão em soluções à base de peróxidos alcalinos e incubação

| Grupos | Tubos com os corpos de prova | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10* | 11* | 12* | 13* | 14* |
| CP | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| MI | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| FX | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |

CP (Controle Positivo), FX (Fixodent). MI (NitrAdine, Medical Interporous); * CN (Controle Negativo: avaliação da esterilidade), (+): indica turvação do meio, (-) indica ausência de turvação.

Os resultados mostraram turvação dos meios de cultura para todos os grupos experimentais e grupo controle positivo (CP), indicando crescimento do biofilme multiespécies avaliado. A esterilidade dos corpos de prova do grupo CN foi comprovada pela ausência de turvação.

## 4.2 Avaliação do pH e peso de cada higienizador

**Tabela 5.** Avaliação do peso de cada pastilha e pH de cada higeinizador

| Higienizadores | Peso de cada Pastilha (g) | pH (37 ± 2°C) |
|---|---|---|
| NitrAdine Medical Interporous (MI) | 1,96 g | 3,3 |
| Fixodent Advanced Whitenning (FX) | 2,46 g | 9,5 |

## 4.3 Análise da atividade antimicrobiana das soluções higienizadoras

Os dados originais da contagem total de UFC/mL estão apresentados no Apêndice II (Tabelas II -2 a II - 4). As tabelas 6 a 8 mostram as leituras do total de UFC/mL, após transformação em log (UFC +1), para cada micro-organismo do biofilme avaliado após a imersão em cada uma das soluções higienizadoras, sendo calculado a média e desvio padrão para *C. albicans*, que apresentou distribuição normal e mediana e intervalo de confiança para *P. aeruginosa* e *S. aureus* que apresentaram distribuição não normal.

**Tabela 6.** *C.albicans* - Total de UFC/mL, em $log_{10}$ (UFC +1)

| Espécimes | Grupo CP | Grupo FX | Grupo MI |
|---|---|---|---|
| **1** | 3,79 | 3,97 | 1,61 |
| **2** | 4,67 | 2,74 | 2,50 |
| **3** | 4,33 | 1,90 | 0,00 |
| **4** | 2,30 | 2,92 | 1,61 |
| **5** | 3,47 | 2,08 | 1,61 |
| **6** | 3,63 | 1,61 | 3,43 |
| **7** | 4,54 | 3,81 | 3,01 |
| **8** | 4,92 | 3,55 | 1,61 |
| **9** | 4,91 | 4,03 | 3,77 |
| **Média** | 4,06 | 2,96 | 2,13 |
| **Desvio Padrão** | 0,85 | 0,94 | 1,17 |

**Tabela 7.** *P. aeruginosa* - Total de UFC/mL, em $log_{10}$ (UFC +1)

| Espécimes | Grupo CP | Grupo FX | Grupo MI |
|---|---|---|---|
| **1** | 6,35 | 3,80 | 0,00 |
| **2** | 6,59 | 2,08 | 0,00 |
| **3** | 5,76 | 2,20 | 0,00 |
| **4** | 6,24 | 0,00 | 0,00 |
| **5** | 6,65 | 2,96 | 4,03 |
| **6** | 6,43 | 4,43 | 0,00 |
| **7** | 6,50 | 5,50 | 0,00 |
| **8** | 6,71 | 3,12 | 0,00 |
| **9** | 5,62 | 2,60 | 3,30 |
| **Mediana (Intervalo de Confiança)** | 6,43 (6,02; 6,61) | 2,96 (1,76; 4,17) | 0,00 (-0,43; 2,06) |

**Tabela 8.** *S.aureus* - Total de UFC/mL, em $log_{10}$ (UFC +1)

| Espécimes | Grupo CP | Grupo FX | Grupo MI |
|---|---|---|---|
| **1** | 5,00 | 1,90 | 4,83 |
| **2** | 5,66 | 3,21 | 3,59 |
| **3** | 5,61 | 0,00 | 3,54 |
| **4** | 5,67 | 0,00 | 1,90 |
| **5** | 6,72 | 3,33 | 3,22 |
| **6** | 5,43 | 3,86 | 3,38 |
| **7** | 5,86 | 0,00 | 4,80 |
| **8** | 6,78 | 0,00 | 3,76 |
| **9** | 6,06 | 3,10 | 3,79 |
| **Mediana (Intervalo de Confiança)** | 5,67 (5,41; 6,31) | 3,59 (2,97; 4,31) | 1,90 (0,40; 3,01) |

A Tabela 9 apresenta os resultados e a análise estatística para $\log_{10}$ (UFC+1) (*C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*), para as soluções higienizadoras avaliadas.

**Tabela 9.** Valores de UFC/mL em log 10 (UFC + 1) e do teste Kruskal-Wallis

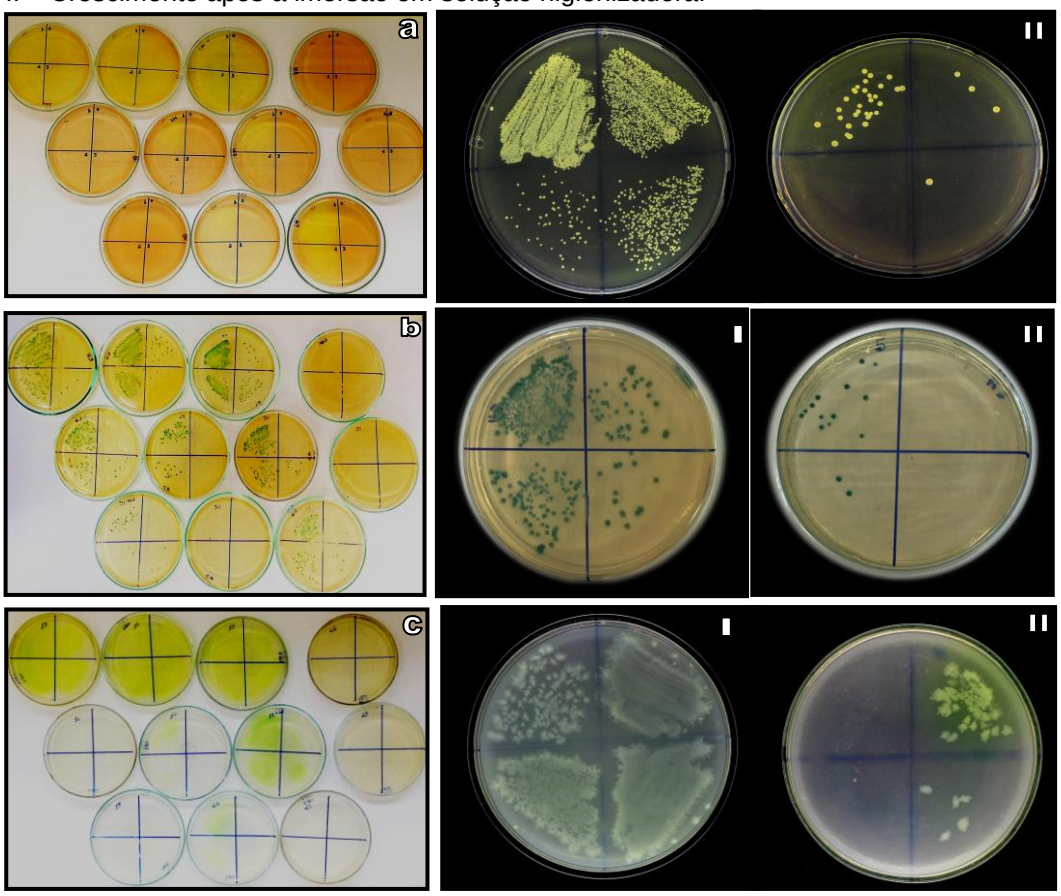
| Grupos | Micro-organismos | | |
|---|---|---|---|
| | ***C. albicans**** | ***P. aeruginosa***** | ***S. aureus***** |
| **CP** | 4,02 (0,85)[a] | 6,43 (6,02; 6,61)[a] | 5,67 (5,41; 6,31)[a] |
| **FX** | 2,96 (0,94)[ab] | 2,96 (1,76; 4,17)[b] | 3,59 (2,97; 4,31)[b] |
| **MI** | 2,13 (1,17)[b] | 0,00 (-0,43; 2,06)[b] | 1,90 (0,40; 3,01)[b] |
| **Valor de P** | 0,002 | <0,001 | <0,001 |

CP (Controle Positivo), FX (Fixodent). MI (NitrAdine, Medical Interporous); *Média (desvio padrão) – ANOVA e pós teste de Tukey; **Medianas (intervalo de confiança 95%) – Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn; [ab]Para cada coluna, letras iguais indicam semelhanças estatísticas ($p > 0,05$).

Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos [Ca ($p=0,002$), Pa ($p<0,001$) e Sa ($p<0,001$)] havendo redução significante do número de UFC/mL de *C. albicans* (Grupo MI), de *P*. aeruginosa (Grupos FX e MI) e *S. aureus* (Grupo FX e MI), quando comparados ao grupo controle.

A Figura 16 ilustra o crescimento das unidades de colônias microbianas do biofilme, obtidas para leitura e cálculo das UFC/mL, após a imersão nos higienizadores.

**Figura 16. A –** Placas de Manitol Salt de *S. aureus*, **B –** Placas de ,CHROMagar de *C. albicans*, **C –** Placas de Cetrimide de *P.aeruginosa*; I – Crescimento do Grupo Controle, II – Crescimento após a imersão em solução higienizadora.




## 4.4 Avaliação da atividade metabólica

Os dados originais de cada uma das leituras da Absorbância do XTT do Biofilme Multiespécies, estão apresentados no Apêndice II (Tabelas II - 5 a II - 8). A análise da eficácia antimicrobiana das soluções higienizadoras na redução da atividade metabólica do biofilme multiespécies encontra-se descrita a seguir, de acordo com a leitura colorimétrica. Os dados de leitura média de absorbância de cada corpo de prova após a subtração do branco são apresentados nas tabelas 10.

**Tabela 10.** Absorbância no ensaio de XTT do biofilme misto para as soluções

| Espécimes | Grupo CP | Grupo FX | Grupo MI |
|---|---|---|---|
| **1** | 0,063 | 0,002 | 0,016 |
| **2** | 0,050 | 0,085 | 0,001 |
| **3** | 0,037 | 0,000 | 0,000 |
| **4** | 0,141 | 0,029 | 0,002 |
| **5** | 0,094 | 0,039 | 0,000 |
| **6** | 0,121 | 0,000 | 0,000 |
| **7** | 0,068 | 0,000 | 0,000 |
| **8** | 0,039 | 0,030 | 0,000 |
| **9** | 0,102 | 0,000 | 0,001 |
| **Mediana (Intervalo de Confiança)** | 0,068 (0,046; 0,190) | 0,001 (-0,006; 0,058) | 0,000 (- 0,002; 0,066) |

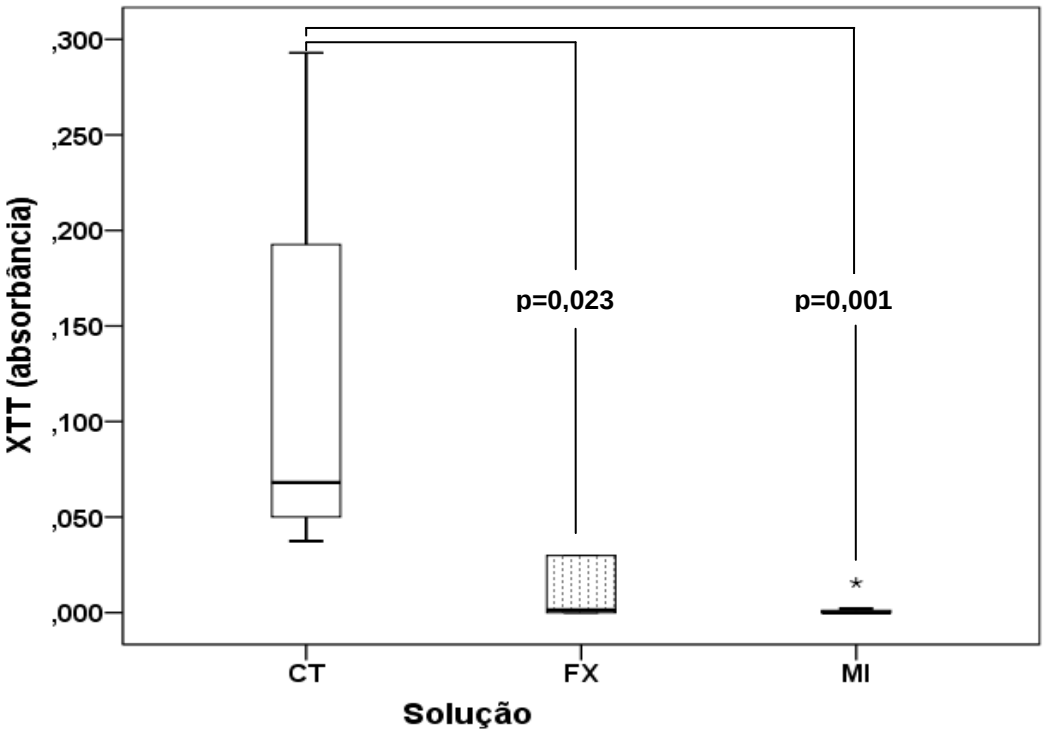
A Tabela 11 apresenta as comparações estatísticas entre as soluções.

**Tabela 11.** Análise comparativa das Unidades de Absorbância (XTT) em relação às soluções higienizadoras avaliadas.

| Grupos | $10^{-3}$ AU (unidades de absorbância) * |
|---|---|
| **CP** | 0,068 (0,046 – 0,190)[a] |
| **FX** | 0,001 (-0,006 – 0,058)[b] |
| **MI** | 0,000 (- 0,002 – 0,066)[b] |
| **Valor de p** | <0,001 |

CP (Controle Positivo), MI (NitrAdine, Medical Interporous); FX (Fixodent); *Medianas (intervalo de confiança 95%) - Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn; [ab]Para cada coluna, letras iguais indicam semelhanças estatísticas (p > 0,05).

**Figura 17**. Análise comparativa das Unidades de Absorbância (XTT) em relação às soluções higienizadoras avaliadas



A Figura 17 mostra que a imersão nas soluções à base de peróxidos reduziu significativamente a atividade metabólica do biofilme multiespécies (p=0,001), quando comparadas ao Grupo Controle, sem diferença significante entre elas (p=0,883).

### 4.5 Avaliação da viabilidade do biofilme

Os dados originais referentes a cada uma das áreas do biofilme multiespécies como os percentuais de cada área, após a imersão nas soluções higienizadoras estão apresentados no Apêndice II (Tabelas II - 9 a II - 11). A Tabela 12 apresenta os resultados da viabilidade do biofilme após a exposição às soluções higienizadoras.

**Tabela 12**. Viabilidade do biofilme multiespécies – Área Viva e Total do biofilme (um²) e o Percentual das Áreas (%), após imersão nas soluções.

| Grupo CP | | Grupo FX | | Grupo MI | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Área Viva/ Área Total imagem (%)** | **Área do Biofilme/ Área Total da imagem (%)** | **Área Viva/ Área Total imagem (%)** | **Área do Biofilme/ Área Total da imagem (%)** | **Área Viva/ Área Total imagem (%)** | **Área do Biofilme/ Área Total da imagem (%)** |
| 1,83 | 91,36 | 0,00 | 74,15 | 8,61 | 80,27 |
| 1,70 | 82,52 | 9,17 | 61,91 | 18,93 | 78,72 |
| 0,00 | 83,26 | 5,33 | 85,09 | 21,84 | 81,07 |
| 16,74 | 96,96 | 2,14 | 77,36 | 29,76 | 80,61 |
| 28,07 | 85,93 | 0,00 | 72,14 | 28,11 | 73,59 |
| 29,29 | 85,69 | 25,78 | 86,45 | 22,06 | 76,72 |
| 13,26 | 97,76 | 8,07 | 73,81 | 5,23 | 66,88 |
| 0,00 | 65,14 | 0,00 | 57,63 | 31,39 | 83,55 |
| 7,78 | 92,20 | 7,81 | 80,78 | 0,00 | 68,02 |
| 0,33 | 90,20 | 6,28 | 88,37 | 18,36 | 86,08 |
| 11,88 | 93,02 | 6,62 | 82,68 | 0,00 | 67,09 |
| 17,95 | 92,74 | 17,69 | 86,39 | 20,08 | 78,12 |
| 26,76 | 97,82 | 6,35 | 85,30 | 41,64 | 94,29 |
| 12,92 | 93,27 | 0,00 | 87,37 | 0,00 | 90,93 |
| 15,51 | 91,48 | 8,69 | 87,78 | 5,33 | 82,31 |
| 27,61 | 93,25 | 3,37 | 86,29 | 0,00 | 73,76 |
| 34,53 | 90,11 | 0,00 | 84,46 | 0,00 | 46,24 |
| 15,36 | 93,60 | 10,77 | 97,97 | 9,85 | 89,56 |
| 7,60 | 91,06 | 26,42 | 91,87 | 11,96 | 69,82 |
| 21,43 | 88,90 | 18,60 | 88,77 | 0,00 | 58,00 |

A Tabela 13 apresenta os resultados estatísticos da efetividade antimicrobiana das soluções higienizadoras sobre a redução da viabilidade do biofilme multiespécies.

**Tabela 13.** Percentual de Área- Medianas (e intervalo de confiança 95%) e valores do teste

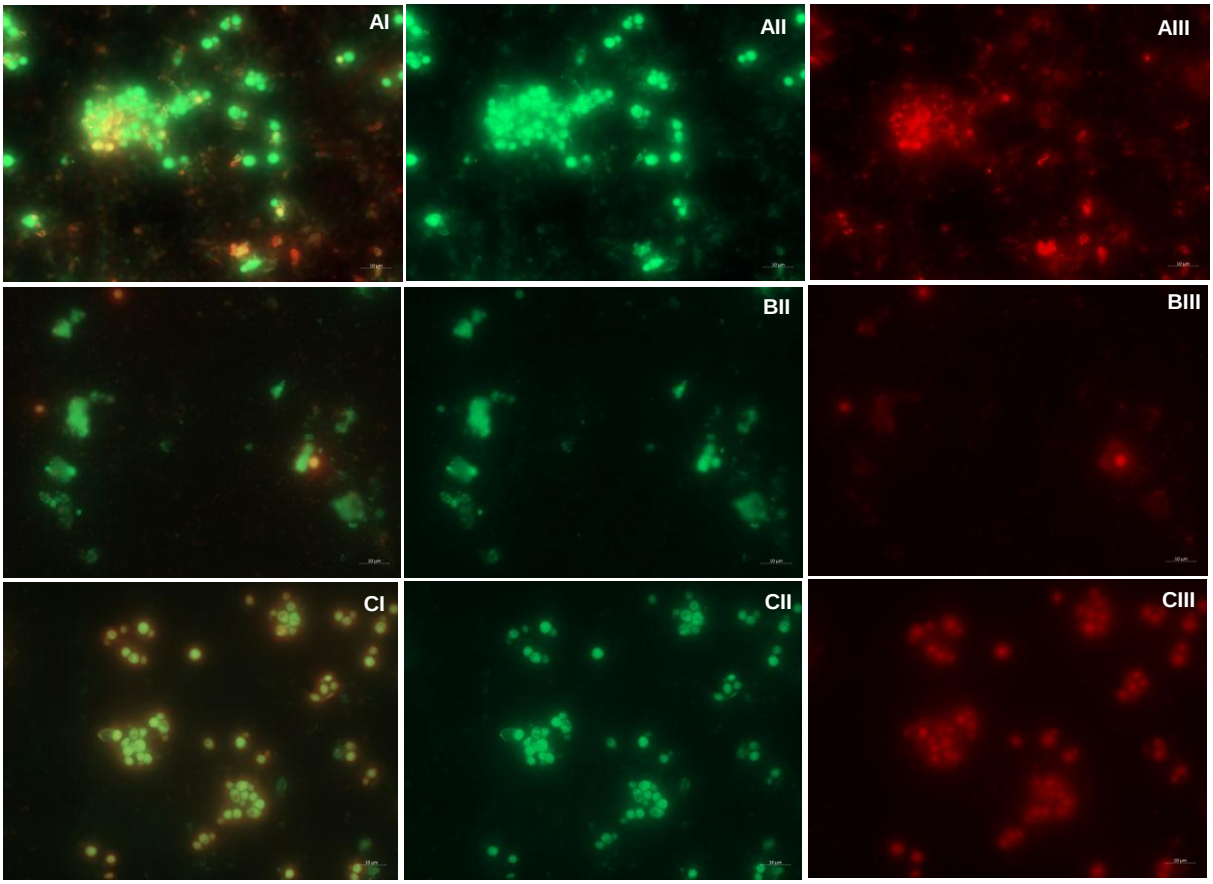
| Grupos | *Biofilme Multiespécies** | | Valor de P*** (Wilcoxon) |
|---|---|---|---|
| | ***Área Viva*** | ***Área Total*** | |
| **CP** | 14,31 (9,44; 19,61)[a♦] | 91,42 (86,44, 93,18)[a] | <0,001 |
| **FX** | 6,48 (4,34; 11,96)[a♦] | 85,19 (77,23; 86,42)[b] | <0,001 |
| **MI** | 10,90 (7,68; 19,63)[a♦] | 78,42 (70,91; 81,65)[b] | <0,001 |
| **Valor de P** (Kruskal-Wallis)** | 0,166 | < 0,001 | |

CP (Controle Positivo), MI (NitrAdine, Medical Interporous); FX (Fixodent); *Medianas (intervalo de confiança 95%); **Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn; [ab]Para cada coluna, letras iguais indicam semelhanças estatísticas (p > 0,05); *** Wilcoxon; [♦]Indica diferença significante entre a área viva e a área total do biofilme .

Os resultados mostraram que os higienizadores não conseguiram remover todas as células mortas do biofilme multiespécies (% área de biofilme total ≠ % área de biofilme vivo), durante o tempo de imersão recomendado pelo fabricante. Além disso, os higienizadores não conseguiram eliminar todas as células presentes no biofilme, sendo observadas células vivas remanescentes para todas as soluções higienizadoras avaliadas. Houve redução significativa da área total do biofilme após a imersão nos higienizadores a base de peróxidos, quando comparados ao grupo controle (p<0,001). Quando comparados às áreas de biofilme vivo com as áreas de biofilme total, pelo teste de Wilcoxon, pode-se observar diferenças entre as áreas do biofilme multiespécies após a imersão nas soluções avaliadas.

A Figura 18 ilustra os resultados da viabilidade do biofilme multiespécies após a imersão nas soluções higienizadoras, obtidos pela análise da Microscopia de Epifluorescência.

**Figura 18.** Imagens da Microscopia de Epifluorescência, I: Sobreposição das Áreas Vivas e Mortas do Biofilme Multiespécies; **II:** Área Total do Biofilme Multiespécies e **III:** Área Morta do Biofilme multiespécies. A - após a imersão em PBS; B - após a imersão em FX; C - após a imersão em N.



# 5. Discussão

# 5 DISCUSSÃO

As hipóteses nulas deste estudo foram rejeitadas uma vez que os higienizadores a base de peróxidos influenciaram a redução da carga microbiana total, bem como, a atividade metabólica e viabilidade do biofilme; embora, nenhum dos higienizadores tenha conseguido eliminar todas as células e remover completamente as células mortas.

A cavidade oral é um ambiente constantemente exposto a micro-organismos oportunistas, que são mantidos sob controle pelo sistema imunológico (Sumi et al., 2002; Coulthwaite et al., 2007; Coco et al., 2008; Glass et al., 2010; Kossion et al., 2011; O'Donnell et al., 2015; Zago et al., 2015). Esses micro-organismos formam biofilmes como estratégia de sobrevivência podendo tanto se desenvolver em superfícies bióticas como abióticas (Chandra el al., 2001; Baena-Monroy et al., 2005; Coenye et al., 2008, Azevedo et al., 2012). A presença desses biofilmes associada à precariedade da higiene oral pode contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias (O'Toole et al., 2000; Donlan, 2002; Azeredo e Sutherland, 2008), tal como a Estomatite Protética (Arendorf; Walker, 1987; Barbeau et al., 2003; Coelho; Souza; Daré, 2004; Kossion et al., 2011; O'Donnell et al., 2016, Badaró et al., 2017).

A adoção de práticas de higiene diárias que envolvam associação entre o métodos mecânicos e agentes químicos pode contribuir para reduzir o risco de infecções recorrentes e persistentes, principalmente em pacientes idosos (Ramage et al., 20004; Ramage et al., 2012; O'Donnell et al., 2016). Entretanto, levando em consideração a complexa arquitetura dos biofilmes, em decorrência do grau de maturação, torna-se fundamental que esses higienizadores apresentem ação antimicrobiana (Nikawa et al., 1999; Kiesow et al., 2016). Nesse sentido, os objetivos desse estudo foram avaliar a efetividade antimicrobiana dos higienizadores à base de peróxido frente a biofilme multiespécies e o impacto desses higienizadores na redução da carga microbiana, atividade metabólica e biofilme agregado mediante a interações fungo-bactérias.

Os peróxidos apresentam ingredientes ativos, tais como, dióxido de titânio, lauril sulfato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), Tetra Acetil Etileno Diamina (TAED) e bicarbonato de sódio que podem potencializar a efetividade antimicrobiana desses higienizadores (Alves et al., 2011; Dhamange et al., 2012; Coimbra et al., 2016). Moore et al. (1984) observaram que somente dois dos seis

higienizadores apresentaram eficácia contra leveduras, o que, segundo os autores, poderia ser explicado pela presença de lauril sulfato de sódio. Dhamange et al. (2012) observaram que a presença do lauril sulfato de sódio aumentou a capacidade lítica do higienizador Clinsodent na remoção do biofilme de *Candida*. O lauril sulfato de sódio apresenta capacidade de adsorção e interação com componentes da membrana celular dos micro-organismos, promovendo aumento da permeabilidade e consequente lise celular (Dhamande *et al*., 2012; Kumar et al., 2012; Pellizarro *et al*., 2012).

Sousa et al. (2009) ressaltaram que a presença de altas concentrações de bicarbonato de sódio pode contribuir para a efetividade antimicrobiana desses higienizadores. Segundo Alves et al. (2011), a presença de ácido cítrico associado ao tempo de exposição pode ter contribuído para a ação do higienizador Novafix. O ácido cítrico consegue quebrar as pontes de íons cálcio que atuam como sítios de ligação química para as cadeias poliméricas extracelulares (Dhamande et al., 2012).

A presença do EDTA também vem sendo atribuída à efetividade de alguns peróxidos (Pellizzaro et al., 2012; Coimbra et al., 2016; Paranhos, 2015). O EDTA é um agente quelante, que causa danos na membrana celular, altera a permeabilidade celular e facilita, assim, a ação dos agentes antimicrobianos (Pellizzaro et al., 2012). A associação do EDTA com outros ingredientes ativos, tal como o TAED, pode influenciar a efetividade antimicrobiana dos higienizadores, embora a concentração seja um fator importante a ser considerado (Coimbra et al., 2016). O TAED potencializa a reação do perborato de sódio, contribuindo dessa maneira, para maior liberação de oxigênio ativo em menor intervalo de tempo (Celik et al., 2008).

Entretanto, a presença de arquiteturas mais complexas, mediante a associação de micro-organismos, pode dificultar o acesso de agentes antimicrobianos dentro do biofilme (Harriot et al., 2009; Peters et al., 2010; O'Donnell et al., 2015; O'Donnell. et al., 2016). No presente estudo, a análise de UFC/mL demostrou efetividade dos higienizadores na redução da carga microbiana total do biofilme. Pelos resultados obtidos o higienizador NitrAdine conseguiu diminuir 2 logs de UFC/mL de *C. albicans* quando comparado ao grupo controle, enquanto o Fixodent não apresentou ação significativa em relação ao grupo controle, reduzindo 1 log a contagem de unidades formadora de *C. albicans*. Entretanto, de acordo com a Associação Francesa de Normalização, um higienizador pode ser considerado biocida contra as culturas planctônicas, quando resulta em pelo menos, redução de

10 vezes (ou seja, uma redução logarítmica) em números celulares. Segundo essa Normalização a redução de 4 ou 5 log é necessária para que produto possa ser considerado fungicida ou bactericida, respectivamente (Associação Francesa de Normalização, 2006). Por outro lado, segundo os estudos de Davies et al. (2004) e Stewart et al. (2011) em biofilmes multiespécies a concentração de um agente antimicrobiano tem que ser 10 a 1000 vezes maior do que a concentração necessária para culturas planctônicas.

Tanto o higienizador Fixodent como o NitrAdine causaram redução significativa nos valores de UFC/mL de *P. aeruginosa* e *S.aureus*, quando comparados ao grupo controle. O NitrAdine conseguiu reduzir em até 6 logs a contagem de unidades formadoras de *P. aeruginosa*, enquanto o Fixodent reduziu em 3 logs. Para o *S. aureus* pode-se observar que, embora ambos os higienizadores tenham dimuído a contagem do log de UFC/mL, o higienizador NitrAdine conseguiu reduzir em até 3 logs a contagem de unidades formadora de colônias; enquanto o Fixodent reduziu 1 log da mesma contagem. Nossos achados concordam com os de Coimbra et al., (2016) que verificoram que dos oito higienizadores à base de peróxidos, somente o NitrAdine apresentou ação significativa na redução da contagem de UFC/mL de *C. albicans*. Paranhos (2015) mostrou que dos oito peróxidos avaliados somente o NitrAdine consegui reduzir significativamente a contagem de UFC/mL de *C. albicans*.

A efetividade do NitrAdine pode ser atribuída a alguns fatores como a fórmula NitrAdine TM (Glass et al., 2004, Coenye et al., 2008 e Silva-Lovato et a., 2010) bem como o pH da solução. O Nitradine TM é uma formulação com propriedades de desinfecção, que apresenta alta atividade de remoção do biofilme in vitro contra uma variedade de micro-organismos, tais como *Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, incluindo o tipo de MRSA, e vírus (Glass et al., 2004; Silva-Lovato et al., 2010). Além disso, nossos resultados verificaram que o pH desse higienizador é predominantemente ácido em temperatura morna (37º $\pm$ 2ºC), o que pode ter influenciado na efetividade antimicrobiana do higienizador.

Por outro lado, o higienizador Fixodent, que apresenta pH alcalino, embora não tenha conseguido reduzir significativamente a quantidade de UFC/ml de *C. albicans*, consegui reduzir em até 3 logs a contagem de unidades formadora de *P. aeruginosa* e mais de 1 log a contagem de *S. aureus*. Paranhos (2015) verificou que

esse mesmo higienizador apresentou ação intermediária frente a redução microbiana do biofilme mono espécie de *C. albicans* e significativa frente aos biofilmes mono espécie de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, entretanto, o higienizador NitrAdine diminuiu a atividade metabólica de *S.aurues* a zero. Tais divergências com esse estudo podem ser atribuídas à presença de biofilme multiespécies que, segundo a literatura, apresenta menor suscetibilidade à agentes antimicrobianos do que biofilmes mono espécies (Hoffman et al., 2006; Harriott et al., 2009, 2010; Simoes et al., 2010). A produção de matriz extra polimérica pelos micro-organismos presentes também dificulta a difusão desses agentes no biofilme; auxiliando, dessa maneira, o desenvolvimento de mecanismos de resistência desses biofilmes (Donlan & Costerton 2002; Peters et al., 2010).

Outro método utilizado para a quantificação da viabilidade do biofilme foi o ensaio de XTT para a avaliação da atividade metabólica do biofilme após a exposição aos agentes higienizadores. Esse método é uma complementação do método de quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC/mL), levando em consideração que este último quantifica todas as células viáveis, inclusive as de baixa atividade metabólica.

O higienizador NitrAdine consegui reduzir a atividade metabólica do biofilme multiespécies, influenciando na redução significativa da carga microbiana de UFC/mL de *C. albicans, S. aureus* e *P. aeruginosa,* quando comparado ao grupo controle. Paranhos (2015) verificou que dos oito peróxidos avaliados somente o NitrAdine e Fixodent conseguiram reduzir significativamente a atividade metabólica dos biofilme mono espécies de *C. albicans*. Segundo o estudo, tanto o Fixodent como o NitrAdine diminuíram significativamente a atividade metabólica dos biofilmes mono espécies de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo que, o higienizador NitrAdine reduziu a zero a atividade do biofilme mono espécie de *S. aureus*.

Entretanto, se compararmos as metodologias de quantificação das unidades formadoras de colônias com a de quantificação da atividade metabólica podemos verificar na Tabela 9 que o Fixodent apresentou ação intermediária frente às espécies de *C. albicans*, pois provavelmente os danos causados pela imersão nesse higienizador foram danos imediatos capazes de causar redução do metabolismo no período de 2 horas, tempo de incubação para ensaio de XTT, porém não irreversível o que possibilitou que esses micro-organismos se reproduzissem após 20 horas de incubação e não se tornassem tão suscetíveis ao higienizador. Nossos achados

concordam com Panariello et al. (2016) que verificaram que a associação entre a escovação e a imersão em Corega Tabs reduziu 96,2% a atividade do biofilme multiespécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* em resinas utilizadas para confecção de prótese. Os autores relataram que a imersão, como método único, em higienizador à base de peróxido reduziu 55,3% a atividade do biofilme multiespécies presentes na resina Lucitone e 37,1% na resina Tokuyama. Li et al. ( 2010) ao avaliarem a eficácia antimicrobiana do higienizador Polident em biofilmes mono espécies de *C. albicans* e multiespécies de *C. albicans* e *S. mutans,* em diferentes materiais dentários, verificaram que a eficácia variou em decorrência da superfície e tipo de biofilme. Os autores concluíram que os biofilmes mono espécies são mais suscetíveis ao tratamento com agentes antimicrobianos.

Os dados obtidos pela microscopia de epifluorescência demostraram que nenhum dos higienizadores apresentou diferença significativa da área viva em relação ao controle. Entretanto, tanto o Fixodent como o NitrAdine apresentaram diferença em relação área total do biofilme quando comparados ao controle. Os resultados indicam que ambos os higienizadores apresentaram diferenças significativas entre a área viva e total. O que corresponde ao fato dos higienizadores ter diminuído o biofilme agregado, pois conseguiram matar algumas células, ainda que, não tenham conseguido removê-las totalmente, no tempo recomendado pelo fabricante.

Adicionalmente, na Figura 18 podemos observar maior predomínio de células de leveduras mortas nas imagens do higienizador NitrAdine e de bactérias mortas nas imagens referentes aos higienizador Fixodent, confirmando os achados obtidos pelo método de quantificação das unidades formadoras de colônias. Lucena-Ferreira et al. (2014) verificaram que a imersão diária em Polident diminui o total de micro-organismos; entretanto, o número total de *C. albicans* aumentou em todos os biofilmes expostos ao higienizador, sendo identificados hifas na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal (MC).

O tempo de imersão parece também ser uma das variáveis da efetividade antimicrobiana. De acordo com Shay (2000) alguns higienizadores são mais efetivos quando usados durante o período do sono. Segundo Coenye et al. (2008) o tempo de exposição ao higienizador deve ser suficientemente longo, ou seja de 10 a 15 minutos, para que o desinfetante penetre no biofilme e apresente reduções significativas. Jose et tal. (2010) observaram que o Steradent Active Plus foi

significativamente mais eficaz em 10 minutos do que na imersão *overnight*. Iseri et al. (2011) verificaram que o aumento do tempo (15, 30 e 60 minutos) de exposição ao higienizador Fittydent reduziu significativamente o número de *Candida spp* após 60 minutos; mas, para o Efferdent e o Polident, o tempo não influenciou na otimização da efetividade desses higienizadores. Entretanto, Ducky et tal. (2013) observaram que o uso, durante o sono, de higienizadores à base de peróxidos reduz a massa e a patogenicidade do biofilme da prótese em relação ao armazenamento em água e a seco, contribuindo dessa maneira, para a saúde do paciente.

Outro fator importante a ser considerado é o tipo de biofilme avaliado. Paranhos et al. (2009) ao avaliarem o efeito dos métodos de higienização mecânico, químico e associado, em relação a diferentes micro-organismos (*S. aureus, S. mutans, E. coli, C. albicans, P. aeruginosa, E.* faecalis, *C. glabrata e C. tropicalis*) verificaram que a efetividade dos métodos depende do tipo de biofilme formado na resina acrílica. Coimbra et al. (2016) reportaram que o potencial patogênico de cada espécie, assim como as diferenças entre as formulações dos higienizadores, classificados como peróxidos, podem influenciar a efetividade antimicrobiana desses higienizadores. Adicionalmente, a literatura reporta menor suscetibilidade dos biofilmes multiespécies à ação dos agentes antimicrobianas (Harriot et al., 2009; Peters et al., 2010; O'Donnell et al., 2015; O'Donnell. et al., 2016).

O sinergismo entre as espécies como *C. albicans* e *S. aureus* em biofilmes multiespécies parece corroborar para a maior tolerância aos agentes antimicrobianos (Zago et al., 2015). A produção de matriz extracelular de *C. albicans* sobre *S. aureus* promove um efeito protetor sobre esta espécie e diminui a exposição aos agentes antimicrobiano, permitindo assim, um tempo maior para a defesa desta espécie (Harriot et al., 2009).

O potencial patogênico dos biofilmes, assim como, as diferentes formulações comercialmente disponíveis podem contribuir para a falta de consenso, na literatura, sobre a efetividade antimicrobiana dos peróxidos. Estudos reportam a efetividade antimicrobiana desses higienizadores frente a biofilmes mono espécies (Moore; Smith; Kenny. 1984; Nakamoto et al., 1991; Gornistsky et al., 2002; Silvia 2008; Sirnivisan et al., 2010; Lee et al., 2011; Fernandes et al., 2011; Pellizzaro et al., 2012; Dhamande et al., 2012; Kumar et al., 2012; Ramage et al., 2012; Izumi et al., 2016; Coimbra et al., 2016), multi-espécies (Li et al., 2010; Lucena-Ferreira et al., 2014), assim como, recomendem o uso como protocolo de higienização rotineira de

próteses totais (Silva-Lovato et al., 2010; Nishi et al., 2012) e para o armazenamento da prótese durante o sono (Ducky et al., 2013; Ducky et al., 2016). Por outro lado, outros estudos, reportam a ineficácia desses higienizadores na redução da carga microbiana (Montagener et al., 2009; Lee et al., 2009; Ferreira et al., 2009; Vieira 2010; Vasconcelos, 2017).

O biofilme protético representa um importante fator de risco ao desenvolvimento da Estomatite Protética (Silvia-Lovato et al., 2010; Badaró et al., 2017) e infecções sistêmicas recorrentes (Maeda et al., 2007; Coco et al., 2008; Pereira-Cenci et al., 2010; Peters et al., 2012; Lucena- Ferreira et al., 2014). O presente estudo observou que os higienizadores à base de peróxidos avaliados reduziram a atividade metabólica do biofilme. Entretanto, a redução da atividade metabólica do biofilme, causada pelo higienizador Fixodent, não foi suficiente para reduzir a viabilidade das unidades formadoras de *C. albicans*. Por outro lado, ambos os higienizadores conseguiram reduzir o biofilme agregado nos corpos de prova. Abelson (1981) demonstrou que os higienizadores Efferdent e Polident só foram capazes de remover 30% do biofilme acumulado em uma prótese com higienização inadequada. Nikawa et al. (1999) ressaltaram a indicação da literatura para a utilização de higienizadores químicos como protocolos de higiene diário das próteses. Nesse sentido, novas análises de biofilmes multiespécies devem ser conduzidas para a verificação do uso de higienizadores a base de peróxidos como coadjuvantes de protocolos de higienização diária, tanto em in vitro como in vivo; considerando esses produtos alternativa mais viável a pacientes idosos, idosos dependentes ou pacientes com dificuldades de realizar a higienização por métodos mecânicos, como a escovação.

Uma das limitações da pesquisa foi à avaliação da efetividade desses higienizadores frente ao biofilme multiespécies formados por três micro-organismos, em única imersão, entretanto o biofilme da prótese é muito mais complexo e diversificado (O'Donnell et al., 2015; O'Donnell et al., 2016) necessitando de futuros estudos para a confirmação desses achados. Adicionalmente, os resultados obtidos aqui devem ser visto com cautela, visto que, o estudo foi in vitro e, portanto, não reproduz totalmente a realidade clínica. Dessa forma, tornam-se necessários mais estudos, sobretudo clínico, para a validação do uso desses produtos em protocolos de higiene diários.

Futuras pesquisas devem também ser conduzidas para a avaliação do mecanismo de ação desses higienizadores, tendo em vista as diferentes formulações comercialmente existentes e os diferentes potenciais de ação desses higienizadores.

# 6. Conclusão

## 6. CONCLUSÃO

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

1) O higienizador NitrAdine foi mais efetivo na redução da carga microbiana de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do biofilme multiespécies de *C. albicans, P. aeruginosa e S. aureus*;
2) *P. aeruginosa* foi mais suscetível a ação dos higienizadores do que *S. aureus* e *C. albicans*, quando associada em biofilme multiespécies;
3) Ambos os higienizadores conseguiram reduzir a atividade metabólica do biofilme multiespécies de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aurues*;
4) Ambos os higienizadores conseguiram reduzir o biofilme multiespécies de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aurues* agregado aos corpos de prova, embora nenhum dos higienizadores tenha sido capaz de remover todas as células mortas.

# Referências*

* *De acordo com: International Committee of Medial 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*

## REFERÊNCIAS


1. Abe S, Ishihara K, Okuda K. Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care. Arch Gerontol Geriatr. 2001;32(1):45-55.

2. Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers. J Prosthet Dent. 1981;45(4):376-379.

3. Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers: review of the literature. Gerodontics. 1985;1(5):202-206.

4. Abere DJ. Post-placement care of complete and removable partial dentures. Dent Clin North Am. 1979;23(1):143-151.

5. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting completedentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Am Dent Assoc. 2012;143(3):270-277.

6. Alves DL, Machado P, Meneses R, Neves L, Silvares F. In vitro evaluation of the efficacy of 4 denture cleanser tabs against oral bacteria. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol. 2011;50(1):31-35.

7. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonization of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. J Infect. 2014;69(4): 396-407.

8. Akar GC, Ergul S. The oral hygiene and denture status among residential home residents. Clin Oral Investig. 2008;12(1):61–65.

9. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. J Oral Rehabil. 1987;14(3):217-227.

10. Association Française de Normalisation Antiseptiques et de´sinfectants chimiques – Essai quantitatif de suspension pour l'e´valuation de l'activite´ bacte´ricide de base des antiseptiques et des de´sinfectants chimiques – Me´thode d'essai et prescriptions (phase 1). Paris, France: AFNOR. 2006

11. Axe AS, Varghese R, Bosma M, Kitson N, Bradshaw DJ. Dental health professional recommendation and consumer habits in denture clea nsing. J Prosthet Dent. 2016;115(2):183-188.

12. Azeredo J, Sutherland IW. The use of phages for the Removal of infectious biofilms. Curr. Pharm. Biotechnol. 2008;9:261-266

13. Azevedo NF, Cerca N. Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria. 1ªEd. Porto, Portugal: Publindústria, 2012:396p.

14. Badaró MM, Salles MM, Leite VMF, Arruda CNF, Oliveira VC, Nascimento CD et al. Clinical trial for evaluation of *Ricinus communis* and sodium hypochlorite as denture cleanser. J Appl Oral Sci. 2017;25(3):324-333

15. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005;10: 27–39.

16. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, Koninck L, Avon SL, Lalonde B et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod. 2003;95(1):51-59.

17. Biswas L, Biswas R, Schlag M, Bertram R, Gotz F. Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. 2009;75:6910–6912.

18. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 2005;13:20–26.

19. Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. J Prosthet Dent. 1979;42(6):619-623.

20. Cardoso M, Balducci I, Telles de M, Lourenço EJ, Nogueira Júnior L. Edentulism in Brazil: trends, projections and expectations until 2040. Cien Saude Colet. 2016;21(4):1239-1246.

21. Catão CDS, Ramos INC, Silva Neto JM, Duarte SMO, Batista AUD, Dias AHM. Chemical substance efficiency in the biofilm removing in complete denture. Rev Odontol Unesp. 2007;36(1):53-60.

22. Celik EU, Türkün M, Yapar AG. Oxygen release of tetra acetyl ethylene diamine (TAED). InT Endod J. 2008;41(7):571-576.

23. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al.Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001;80(3): 903-908.

24. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2008;23(5):377–383.

25. Coelho CMP, Sousa, YTCS, Daré, AMZ. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. J Oral Rehabil. 2004;31(2):135-139.

26. Coenye T, De Prijck K, De Wever B, Nelis HJ. Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. J Appl Microbiol. 2008;105(3):733–740.

27. Coimbra FCT, Salles MM, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Pagnano VO et al. Antimicrobial efficacy of complete denture cleansers. Am J Dent. 2016;29(3):149-53.

28. Cooper LF. The current and future treatment of edentulism. J Prosthodont 2009; 18: 116–122

29. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. Br Dent J. 2007;64(4):180–189

30. Council on Dental Materials, Instruments and Equipment. Denture cleansers. J Am Dent Assoc. 1983;106(1):77-79.

31. Dhamande MM, Pakhan AJ, Thombare RU, Ghodpage SL. Evaluation of efficacy of commercial denture cleansing agents to reduce the fungal biofilm activity from heat polymerized denture acrylic resin: an in vitro study. Contemp Clin Dent. 2012;3(2):168-172.

32. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov. 2003;2(2):114-122.

33. Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. J Prosthet Dent. 1988;60(4):467-470.

34. Dikbas I, Koksal T, Calikkocaoglu S. Investigation of the cleanliness of dentures in a university hospital. Int J Prosthodont. 2006;19(3), 294–298.

35. Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):881-890.

36. Douglass CW, Shih A, Ostry L. Will there be a need for complete dentures in the United States in 2020? J Prosthet Dent. 2002;8(7):5–8.

37. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003;11(1): 30-36.

38. Drake D, Wells J, Ettinger R. Efficacy of denture cleansing agents in an in vitro bacteria-yeast colonization model. Int J Prosthodont. 1992;5(3):214–220.

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;41(12),1281–1289.

40. Duyck J, Vandamme K, Krausch-Hofmann S, Boon L, De Keersmaecker K, Jalon E et al. Impact of denture cleaning method and overnight storage condition on denture biofilm mass and composition: A Cross-Over Randomized Clinical Trial. PLoS One. 2016;11(1):1-16

41. El-Solh AA. Association between pneumonia and oral care in nursing home residents. Lung. 2011;189(3):173–180.

42. Felton DA. Complete Edentulism and Comorbid Diseases: An Update. J Prosthodont. 2016;25(1):5-20.

43. Fernandes FDS, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Filho AP, Straioto FG, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on *Candida spp*. biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. J Prosthet Dent. 2011;105(1):51–58.

44. 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;13(2), 237–242

45. Gauch LMR, Pedrosa SS, Silveira-Gomes F, Esteves RA, Marques-da-Silva SH. Isolation of *Candida spp*. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. Braz J Microbiol. 2018;49(1):148-151.

46. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont. 2011;20(4):251-260.

47. Gedik H, Öskan YK. The effect of surface roughness of silicone-based resilient liner materials on the adherence of *Candida albican*s and inhibition of *Candida albicans* with different disinfectants. Oral Health Prev Dent. 2009;7(4):347-353.

48. Glass RT, Bullard JW, Conrad RS, Blewett EL. Evaluation of the sanitization effectiveness of a denture-cleaning product on dentures contaminated with known microbial flora. An in vitro study.Quintessence Int. 2004;35(3):194-199.

49. Glass RT, Conrad RS, Bullard JW,Goodson LB, Mehta A, Stanley JL et al. Evaluation of microbial flora found in previously worn prostheses from the northeast and southwest regions of the United States. J Prosthet Dent. 2010; 103(6):384–389.

50. Gocke R, Gerath F, von Schwanewede H. Quantitative determination of salivary components in the pellicle on PMMA denture base material. Clin Oral Investig. 2002:6(4):227-235.

51. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis. 2008;46(5): 350-359.

52. Gornitsky M, ParadisI I, Landaverde G, Malo AM, Velly AM. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. J Can Dent Assoc. 2002;68(1):39-45.

53. Guzmán JM, Pawliczko A, Beales S, Till C, Voelcker I. Ageing in the twenty-first century: A celebration and a challenge. united nations population fund (UNFPA), New York, and Help Age International, London, 2012;1-190.

54. Handa RK, Jagger DC, Vowles RW: Denture cleansers, soft lining materials and water temperature: what is the effect? Prim Dent Care. 2008;15:53-58

55. Harrison Z, Johnson A, Douglas CW. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. J Oral Rehabil. 2004;31(5):460-467.

56. Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:3914–3922.

57. Harriott MM, Noverr MC. Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:3746–3755.

58. Harriott MM, Noverr MC. Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends Microbiol. 2011;19:557–563.

59. Haumschild MS, Haumschild RJ. The importance of oral health in long-term care. J Am Med Dir Assoc. 2009;10(9):667–671.

60. Henriques A, Vasconcelos C, Cerca N. Why biofilms are important in nosocomial infections: the state of the art. Arquivos de Medicina. 2013;7(1):27-36.

61. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S et al. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(52):19890–19895.

62. Honma K, Tawara Y, Okuda K. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human saliva and on denture surfaces. Bull Tokyo Dent Coll. 1994; 35(4):217-220.

63. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85(2):162–169.

64. Işeri U, Uludamar A, Ozkan Y K. Effectiveness of different cleaning agents on the adherence of *Candida albicans* to acrylic denture base resin. Gerodontology. 2011;28(4), 271–276.

65. Izumi S, Ryu M, Ueda T, Ishihara K, Sakurai K. Evaluation of application possibility of water containing organic acids for chemical cleaning for older adults. Geriatr Gerontol Int. 2016;16(3):300-306.

66. Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing – the best approach. Br Dent J. 1995;178(11):413-417.

67. Jenkins S, Addy M, Newcombe R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthrinses. (II). Effects of 4-day plaque regrowth. J Clin Periodontol 1991;18:145-148.

68. Jose A, Coco B, Milligan S, Young B, Lappin DF, Bagg J et al. Reducing the incidence of denture stomatitis: are denture cleansers sufficient? J Prosthodont. 2010:19(4):252-257.

69. Kart D, Tavernier S, Van Acker H, Nelis HJ, Coenye T. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *P. aeruginosa*. Biofouling. 2014:30(3):377-383.

70. Kiesow A, Sarembe S, Pizzey RL, Axe AS, Bradshaw DJ. Material compatibility and antimicrobial activity of consumer products commonly used to clean dentures. J Prosthet Dent. 2016;115(2):189-198.

71. Kojic, E. M., and R. O. Darouiche. Candida infections of medical devices. Clin Microbiol Rev. 2004;17(2):255-267.

72. Kossioni AE. The prevalence of denture stomatitis and its predisposing conditions in an older Greek population. Gerodontology. 2011:28(2):85-90.

73. Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. J Oral Rehabil. 2002;29(3),300–304

74. Kumar MN, Thippeswamy HM, Raghavendra Swamy KN, Gujjari AK. Efficacy of commercial and household denture cleansers against *Candida albicans* adherent to acrylic denture base resin: an in vitro study. Indian J Dent Res. 2012;23(1):39-42.

75. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med. 2002;95(41):22-26.

76. Lee D, Howlett J, Pratten J, Mordan N, McDonald A, Wilson M, Ready D. Susceptibility of MRSA biofilms to denture-cleansing agents. FEMS Microbiology Lett. 2009;291(2),241–246.

77. Lee HE, Li CY, Chang HW, Yang YH & Wu JH. Effects of different denture cleaning methods to remove *Candida albicans* from acrylic resin denture based material. J. Dental Scien. 2011;6: 216–220.

78. Li L, Finnegan MB, Özkan S, Kim Y, Lillehoj PB, Ho CM et al. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. Mol Oral Microbiol. 2010;25(6),384–390.

79. Lima AB, Leão-Vasconcelos LS, Costa DM, Vilefort LO, André MC, Barbosa MA et al. *Pseudomonas spp* isolated fromthe oral cavity of healthcare workers froman oncology hospital in Midwestern. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2015;57(6):513-514.

80. Linuma T, Arai Y, Abe Y, Takayama M, Fukumoto M,Fukui Y et al. Denture wearing during sleep doubles the risk of pneumonia in the very elderly. J Dent Res. 2015;94:28S-36S.

81. Loster BW, Loster J, Wieczorek A, Ryniewicz W. Mycological analysis of the oral cavity of patients using acrylic removable dentures. Gastroenterol Res Pract. 2012;2012:1-9

82. Lucena-Ferreira SC, Ricomini-Filho AP, Da Silva WJ, Cury JA, Del Bel Cury AA. Influence of daily immersion in denture cleanser on multispecies biofilm. Clin Oral Investig. 2014;.18(9):2179-2185.

83. Maeda Y, Kenny F, Coulter WA, Loughrey A, Nagano Y, Goldsmith CE, et al. Bactericidal activity of denture-cleaning formulations against planktonic health care associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Control. 2007; 35(9):619-622.

84. Marchini L, Tamashiro E, Nascimento DF, Cunha VP. Self-reported denture hygiene of a sample of edentulous attendees at a University dental clinic and therelationship to the condition of the oral tissues. Gerodontology. 2006;21(4):226-228.

85. Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-128.

86. Mesquita DP, Amaral AL, Ferreira EC. Identifying different types of bulking in an activated sludge system through quantitative image analysis. Chemosphere. 2011;85(4):643-652.

87. Mojon P. Thomason JM, Walls AW. The impact of falling rates of edentulismo. Int J Prosthodont. 2004;17(4):434-440.

88. Montagner H, Montagner F, Braun KO, Peres PE, Gomes BP. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. J Appl Oral Sci. 2009;17(5):432–435.

89. Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. J Prosthet Dent. 1984; 52(2):158–163.

90. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. PLoS Pathog. 2010; 6(4):1-4

91. Nadell CD, Xavier JB, Levin SA. The Evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. PLoS Biology 2008;6(1):171-179.

92. Nakamoto K, Tamamoto M, Hamada T. Evaluation of denture cleansers with and without enzymes against *Candida albicans*. J Prosthet Dent. 1991;66(6):792-795

93. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside reline resins. Int J Prosthodont. 2003;16(6):616-620.

94. Neppelenbroek KH. Efetividade de desinfecção de próteses totais por energia de microondas no tratamento da estomatite protética associada à *Candida* spp. [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia; 2005.

95. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque – past and recent concerns. J Dent. 1998;26(4):299-304.

96. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Sadamori S, Agrawal S. Cleansing efficacy of commercial denture cleansers: ability to reduce *Candida albicans* biofilm activity. Int J Prosthodont. 1995;8(6):527–534.

97. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. Int J Prosthodont. 1999;12(2):153-159.

98. Nishi Y, Seto K, Kamashita Y, Take C, Kurono A, Nagaoka E. Examination of denture-cleaning methods based on the quantity of microorganisms adhering to a denture. Gerodontology. 2012;29(2):e259-266.

99. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A et al. The Oral Microbiome of Denture Wearers is Influenced by Levels of Natural Dentition. PLoS One 2015;10(9):1-22.

100. O'Donnell LE, Smith K, Williams C, Nile CJ, Lappin DF, Bradshaw D et al. Dentures are a reservoir for respiratory pathogens. J Prosthodont. 2016;25(2):99-104.

101. O'Toole, G, Kaplan, H, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2000;54: 49-79.

102. Pace CC, McCullough GH. The association between oral microorgansims and aspiration pneumonia in the institutionalized elderly: review and recommendations. Dysphagia. 2010;25(4):307–322.

103. 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;29(3):154-160.

104. Papadaki E, Anastassiadou V. Elderly complete denture wearers: a social approach to tooth loss. Gerodontology. 2012;29(2):e721-727.

105. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. J Oral Rehabil. 2007;34(8):606-612.

106. Paranhos HFO, Davi LR, Peracini A, Soares RB, Silva-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):331-335.

107. Paranhos HFO, 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.

108. Paranhos HFO, 2015. Avaliação in vitro da ação antimicrobiana de soluções higienizadoras de próteses totais. Relatório: Auxílio à Pesquisa-Regular 13/05494-1.

109. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. J Oral Rehabil. 2003;30(5):532-536.

110. Peracini A, Davi LR, De Queiroz Ribeiro N, De Souza RF, Lovato da Silva CH, Paranhos HFO. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. J Prosthodont Res. 2010;54(2):78-83.

111. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá 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),547–554.

112. Pereira-Cenci T, Da Silva WJ, Cenci MS, Cury AA. Temporal changes of denture plaque microbiologic composition evaluated in situ. Int J Prosthodont. 2010;23(3):239–242.

113. Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus -Candida albicans* dual-species biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010;59(3):493-503.

114. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):193-213.

115. Peters BM, Ward RM, Rane HS, Lee SA, Noverr MC. 2013.Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and Staphylococcus aureus polymicrobial biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):74-82.

116. Pizzo G, Guiglia R, Lo Russo L, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. Eur J Intern Med 2010;21:496-502

117. Powell GL, Runnells RD, Saxon BA, Whisenant BK. The presence and identification of organisms transmitted to dental laboratories. J Prosthet Dent. 1990;64(2):235-237.

118. Raj PA, Dentino AR. Denture polymers with antimicrobial properties: a review of the development and current statusof anionic poly(methyl methacrylate) polymers. Future Med Chem. 2013;5(14):1635-1645.

119. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2002;49:973–980.

120. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: A role for Candida biofilms. Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;98(1):53-59.

121. Ramage G, Zalewska A, Cameron DA, Sherry L, Murray C, Finnegan MB et al. A comparative in vitro study of two denture cleaning techniques as an effective strategy for inhibiting *Candida albicans* biofilms on denture surfaces and reducing inflammation. J Prosthodont. 2012;21(7):516-522.

122. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Prevalence of *Candida* spp. associated with bacteria species on complete dentures. Gerodontology. 2012;29(3): 203-208.

123. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect. 2000;2:1721–1731.

124. Salles MM, Oliveira VC, Souza RF, Silva CH, Paranhos HFO. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning - in vitro evaluation. Braz Oral Res. 2015; 29:1-6.

125. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BP, Jayatilake JA, Yeung KW, Yau JY, et al. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. APMIS. 2006; 114(12): 857-866.

126. Serda-Kantarcioglu A, Yücel A. Phospholipase and aspartil protease activities in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 2002;45:160-165.

127. Shay K. Denture hygiene: a review and update. J Contemp Dent Pract. 2000;1(2):28-41

128. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdominteractions: *Candida albicans* and bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2009;299:1–8.

129. Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. J Prosthodont. 2008;17: 627–633.

130. Silva-Lovato CH, Paranhos HFO, Mello PC, Cruz PC, Freitas KM, Macedo LD. Levantamento do grau de instruções e dos materiais e métodos de higiene utilizados por usuários de próteses totais. Rev Odontol Unesp. 2006;35(2):125-131.

131. Silva-Lovato CH, Wever Bd, 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;18(6):560-565.

132. Simoes LC, Simoes M, Vieira MJ. Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. Appl Environ Microbiol. 2010;76:6673–6679.

133. Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. Br Dent J. 2003;195(12):701-703.

134. Sousa FAGC, De Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. Braz Oral Res. 2009;23(4),381–385.

135. Srinivasan M, Gulabani M. A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. Indian J Dent Res. 2010;21(3):353-356.

136. Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Annals of Microbiology. 2011;61:717–732.

137. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001;14:135-138.

138. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004:12(7):317-319.

139. Suma S, Natio M, Wakai K, Natio T, Kojima M, Umemura O et al. Tooth loss and pneumonia mortality: A cohort study of Japanese dentists. PLoS One. 2018:13(4):1-10.

140. Sumi Y, Miura H, Sunakawa M, Michiwaki Y, Sakagami N. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. Gerodontology. 2002;19(1):25-29.

141. Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, Kerr CK, Dominguez BL, Loesche WJ. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. J Am Geriatr Soc. 2001;49(5):557-563.

142. Uludamar A, Ozkan YK, Kadir T, Ceyhan I. In vivo efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on *Candida albicans* in patients with denture stomatitis. J Appl Oral Sci. 2010;18(3):291-296.

143. United Nations Department of Economic and Social Affairs/Population Division 1 World Population Prospects: The 2015 Revision.

144. Vasconcelos GLL Efeito de pastilhas higienizadoras efervescentes nos componentes da Prótese Parcial Removível [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2017.

145. Vieira APC, Senna PM, Silva WJ, Da Del Bel Cury AA. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida spp*. biofilm recolonization on liner surface. Braz Oral Res. 2010;24(3),342–348.

146. Webb DJ, Brown CM. Epi-fluorescence microscopy. Send to Methods Mol Biol. 2013;931:29-59.

147. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP,Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis. 2005;39(3):309-317.

148. Yeater KM, Chandra J, Cheng G, Mukherjee PK, Zhao X, Rodriguez-Zas SL et al. Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. Microbiology. 2007;153:2373–2385.

149. Yildirim-Bicer AZ, Peker I, Akca G, Celik I. In vitro antifungal evaluation of seven different disinfectants on acrylic resins. Biomed Res Int. 2014;2014:1-9

150. Zago CE, Silva S, Sanitá PV, Barbugli PA, Dias CM, Lordello VB et al. Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). PLoS One. 2015;10(4):1-15.

151. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. BMC Microbiol. 2009;9:25-270.

152. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. Int J Prosthodont. 2000;13(2):136-140.

# Apêndices

## APÊNDICE I

**Meios de cultura empregados para contaminação e avaliação da esterilidade/contaminação**

**Brain Heart Infusion Broth caldo** (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) **suplementado com 5% albumina de soro bovino** (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para as cepas *C. albicans, S.aureus e P.aeruginosa*. Modo de preparo: 37,0 g do meio de cultura desidratado *Brain Heart Infusion* foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

**Agar Brain Heart Infusion** (BHI) (Kasvi, Padova, Itália), para as cepas *C. albicans, S.aureus e P.aeruginosa*. Modo de preparo: 52,0 g do meio de cultura desidratado *Agar Brain Heart Infusion* foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

**Agar Cetrimide** (Acumedia, Lansing, Michigan, USA): para a cepa *P. aeruginosa*. Modo de preparo: 45,3 g do meio desidratado Agar Cetrimida foram adicionados em 10mL de 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 minutos, seguindo todas as instruções do fabricante.

**Mannitol Salt Agar (Kasvi, Padova, Itália):** para a cepa *S. aureus*. Modo de preparo: 111 g do meio desidratado Agar Cetrimida foram adicionados em 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com Nistatina (200 UI/mL= 0,0332mg).

**ChromAgar Candida** (Difco Laboratories Inc, Detroit, MI, USA )**:** para as cepas de *C. albicans*. Modo de preparo: 47,7 g do meio de cultura desidratado *ChromAgar Candida* foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

**Letheen Broth (LB)** (Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan, USA)**:** Os espécimes foram transferidos ao meio LB, após a higienização, com objetivo de neutralizar ação de possíveis resíduos dos higienizadores. Esse meio também foi utilizado para avaliação da esterilidade a partir da observação da turvação ou não (teste de esterilidade) do meio. Para cada 25,7 g do meio de cultura desidratado

*Letheen Broth* foram adicionados 1000,0 mL de água destilada. O meio de cultura foi distribuído em alíquotas de 10,0 mL em tubos de ensaio, que posteriormente foram esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

## APÊNDICE II

A Tabela II - 1 apresenta o Teste de Normalidade das variáveis de UFC/mL em log 10 (UFC/mL+1), Unidades de Absorbância (Teste de XTT) e Percentual de Área (Microscopia de Epifluorescência), para a verificação da distribuição dos dados (Teste de Shapiro-Wilk).

**Tabela II - 1.** Teste de Normalidade (Shapiro – Wilk).

| Tests of Normality | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Ensaios Microbiológicos** | **Soluções higienizadoras** | **Shapiro-Wilk** | | |
| | | **Statistic** | **df** | **Sig.** |
| **UFC: *C. albicans*** | **Controle** | 0,895 | 9 | 0,226 |
| | **Fixodent** | 0,903 | 9 | 0,272 |
| | **NitrAdine** | 0,922 | 9 | 0,409 |
| **UFC: *P. aeruginosa*** | **Controle** | 0,864 | 9 | 0,107 |
| | **Fixodent** | 0,973 | 9 | 0,922 |
| | **NitrAdine** | 0,560 | 9 | 0,000 |
| **UFC: *S. aureus*** | **Controle** | 0,922 | 9 | 0,407 |
| | **Fixodent** | 0,900 | 9 | 0,250 |
| | **NitrAdine** | 0,792 | 9 | 0,017 |
| **XTT** | **Controle** | 0,833 | 9 | 0,049 |
| | **Fixodent** | 0,662 | 9 | 0,001 |
| | **NitrAdine** | 0,496 | 9 | <0,001 |
| **Área do Biofilme Vivo** | **Controle** | 0,937 | 20 | 0,207 |
| | **Fixodent** | 0,853 | 20 | 0,006 |
| | **NitrAdine** | 0,901 | 20 | 0,044 |
| **Área do Biofilme Total** | **Controle** | 0,788 | 20 | 0,001 |
| | **Fixodent** | 0,899 | 20 | 0,039 |
| | **NitrAdine** | 0,952 | 20 | 0,396 |

As Tabelas de II - 2 a II - 4 apresentam os dados originais da contagem total de UFC/mL de *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

**Tabela II- 2.** Valores de UFC/mL de *C. albicans,* das triplicatas.

| Espécimes | Grupo CP | Grupo FX | Grupo MI |
|---|---|---|---|
| **1** | 6240 | 9440 | 40 |
| **2** | 47200 | 560 | 320 |
| **3** | 21600 | 80 | 0 |
| **4** | 2000 | 840 | 40 |
| **5** | 3000 | 120 | 40 |
| **6** | 4320 | 40 | 2680 |
| **7** | 35200 | 6560 | 1040 |
| **8** | 83200 | 3600 | 40 |
| **9** | 82800 | 10960 | 5920 |

**Tabela II - 3.** Valores de UFC/mL de *P. aeruginosa,* das triplicatas.

| Espécimes | Grupo CP | Grupo FX | Grupo MI |
|---|---|---|---|
| **1** | 2240000 | 6320 | 0 |
| **2** | 3920000 | 120 | 0 |
| **3** | 584000 | 160 | 0 |
| **4** | 1760000 | 0 | 0 |
| **5** | 4520000 | 920 | 10800 |
| **6** | 2720000 | 27200 | 0 |
| **7** | 3200000 | 320000 | 0 |
| **8** | 5240000 | 1320 | 0 |
| **9** | 420000 | 400 | 2000 |

**Tabela II - 4.** Valores de UFC/mL de *S. aureus,* das triplicatas.

| Espécimes | Grupo CP | Grupo FX | Grupo MI |
|---|---|---|---|
| **1** | 101600 | 68400 | 80 |
| **2** | 460000 | 3920 | 1640 |
| **3** | 412000 | 3520 | 0 |
| **4** | 472000 | 80 | 0 |
| **5** | 5264000 | 1680 | 2160 |
| **6** | 272000 | 2400 | 7360 |
| **7** | 728000 | 64000 | 0 |
| **8** | 6040000 | 5760 | 0 |
| **9** | 1164000 | 6200 | 1280 |

As Tabelas de II - 5 a II - 8 apresentam os dados originais das leituras de Abosrvância do XTT do biofilme mustlespécies.

**Tabela II - 5**. Primeira Leitura de Absorvância do XTT do Biofilme Misto

| Grupos | Amostra/Corpo de Prova | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1/1** | **2/1** | **3/1** | **1/2** | **2/2** | **3/2** | **1/3** | **2/3** | **3/3** |
| **Branco** | 0,0457 | 0,0471 | 0,0646 | - | - | - | - | - | - |
| **CP** | 0,1151 | 0,1423 | 0,1043 | 0,0886 | 0,0967 | 0,0879 | 0,1326 | 0,1441 | 0,1865 |
| **FX** | 0,0420 | 0,0432 | 0,0427 | 0,1316 | 0,0610 | 0,0545 | 0,0456 | 0,0459 | 0,0555 |
| **MI** | 0,0504 | 0,0507 | 0,0460 | 0,0433 | 0,0544 | 0,0453 | 0,0527 | 0,0505 | 0,0586 |

**Tabela II - 6** - Segunda Leitura de Absorvância do XTT do Biofilme Misto

| Grupos | Amostra/Corpo de Prova | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1/1** | **2/1** | **3/1** | **1/2** | **2/2** | **3/2** | **1/3** | **2/3** | **3/3** |
| **Branco** | 0,0459 | 0,0500 | 0,0507 | - | - | - | - | - | - |
| **CP** | 0,1103 | 0,1140 | 0,1115 | 0,1006 | 0,0944 | 0,1019 | 0,0683 | 0,0945 | 0,0960 |
| **FX** | 0,0495 | 0,0505 | 0,0512 | 0,1367 | 0,1342 | 0,1315 | 0,0489 | 0,0465 | 0,0466 |
| **MI** | 0,0545 | 0,0802 | 0,0588 | 0,0508 | 0,0501 | 0,0487 | 0,0472 | 0,0486 | 0,0491 |

**Tabela II - 7 .** Terceira Leitura de Absorvância do XTT do Biofilme Misto

| Grupos | Amostra/Corpo de Prova | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1/1 | 2/1 | 3/1 | 1/2 | 2/2 | 3/2 | 1/3 | 2/3 | 3/3 |
| **Branco** | 0,0457 | 0,0471 | 0,0646 | - | - | - | - | - | - |
| **CP** | 0,1151 | 0,1423 | 0,1043 | 0,0886 | 0,0967 | 0,0879 | 0,1326 | 0,1441 | 0,1865 |
| **FX** | 0,0420 | 0,0432 | 0,0427 | 0,1316 | 0,0610 | 0,0545 | 0,0456 | 0,0459 | 0,0555 |
| **MI** | 0,0504 | 0,0507 | 0,0460 | 0,0433 | 0,0544 | 0,0453 | 0,0527 | 0,0505 | 0,0586 |

**Tabela II - 8.** Média das Leituras de Absorvância do XTT do Biofilme Misto

| Grupos | Média das Amostras/Corpo de Prova | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1/1 | 2/1 | 3/1 | 1/2 | 2/2 | 3/2 | 1/3 | 2/3 | 3/3 |
| **Branco** | 0,0505 | 0,0471 | 0,0535 | - | - | - | - | - | - |
| **CP** | 0,1864 | 0,2053 | 0,1835 | 0,1383 | 0,1476 | 0,1466 | 0,1510 | 0,1649 | 0,1977 |
| **FX** | 0,0721 | 0,0848 | 0,0804 | 0,1067 | 0,0822 | 0,0788 | 0,0465 | 0,0460 | 0,0498 |
| **MI** | 0,0498 | 0,0589 | 0,0492 | 0,0450 | 0,0489 | 0,0450 | 0,0478 | 0,0476 | 0,0508 |

As Tabelas de II - 9 a II - 11 apresentam os dados originais referentes a cada uma das áreas do biofilme multiespécies.

**Tabela II - 9**. Viabilidade do biofilme multiespécies – Área Viva, Morta e Total do biofilme (um²) e o Percentual das Áreas (%), após imersão em PBS.

| Área Verde (um²) | Área Vermelho (um²) | Área Total do biofilme (um²) | Área Total da Imagem (um²) | Área Viva/ Área Total imagem (%) | Área do Biofilme/ Área Total da imagem (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 12282 | 12036 | 12282 | 13443 | 1,83 | 91,36 |
| 11247 | 11015 | 11247 | 13630 | 1,70 | 82,52 |
| 11670 | 11670 | 11670 | 14017 | 0,00 | 83,26 |
| 13035 | 10785 | 13035 | 13443 | 16,74 | 96,96 |
| 11552 | 7779 | 11552 | 13443 | 28,07 | 85,93 |
| 12011 | 7905 | 12011 | 14017 | 29,29 | 85,69 |
| 13202 | 11411 | 13202 | 13505 | 13,26 | 97,76 |
| 8879 | 8879 | 8879 | 13631 | 0,00 | 65,14 |
| 12656 | 11588 | 12656 | 13726 | 7,78 | 92,20 |
| 12764 | 12718 | 12764 | 14150 | 0,33 | 90,20 |
| 12679 | 11060 | 12679 | 13630 | 11,88 | 93,02 |
| 13000 | 10484 | 13000 | 14017 | 17,95 | 92,74 |
| 13334 | 9687 | 13334 | 13631 | 26,76 | 97,82 |
| 12952 | 11158 | 12952 | 13886 | 12,92 | 93,27 |
| 12823 | 10649 | 12823 | 14017 | 15,51 | 91,48 |
| 12828 | 9030 | 12828 | 13757 | 27,61 | 93,25 |
| 12631 | 7791 | 12631 | 14017 | 34,53 | 90,11 |
| 12759 | 10665 | 12759 | 13631 | 15,36 | 93,60 |
| 12645 | 11589 | 12645 | 13886 | 7,60 | 91,06 |
| 12461 | 9457 | 12461 | 14017 | 21,43 | 88,90 |

**Tabela II - 10** . Viabilidade do biofilme multiespécies – Área Viva, Morta e Total do biofilme (um²) e o Percentual das Áreas (%), após imersão no higienizador Fixodent.

| Área Verde (um²) | Área Vermelho (um²) | Área Total do biofilme (um²) | Área Total da Imagem (um²) | Área Viva/ Área Total imagem (%) | Área do Biofilme/ Área Total da imagem (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 10693 | 10693 | 10693 | 14420 | 0,00 | 74,15 |
| 8760 | 7462 | 8760 | 14149 | 9,17 | 61,91 |
| 12154 | 11393 | 12154 | 14284 | 5,33 | 85,09 |
| 10643 | 10349 | 10643 | 13757 | 2,14 | 77,36 |
| 10112 | 10112 | 10112 | 14017 | 0,00 | 72,14 |
| 12117 | 8503 | 12117 | 14017 | 25,78 | 86,45 |
| 10643 | 9480 | 10643 | 14419 | 8,07 | 73,81 |
| 7712 | 7712 | 7712 | 13382 | 0,00 | 57,63 |
| 11323 | 10228 | 11323 | 14017 | 7,81 | 80,78 |
| 12387 | 11507 | 12387 | 14017 | 6,28 | 88,37 |
| 11481 | 10562 | 11481 | 13886 | 6,62 | 82,68 |
| 11776 | 9365 | 11776 | 13631 | 17,69 | 86,39 |
| 11845 | 10963 | 11845 | 13887 | 6,35 | 85,30 |
| 12599 | 12599 | 12599 | 14421 | 0,00 | 87,37 |
| 12189 | 10983 | 12189 | 13886 | 8,69 | 87,78 |
| 11762 | 11302 | 11762 | 13630 | 3,37 | 86,29 |
| 11513 | 11513 | 11513 | 13631 | 0,00 | 84,46 |
| 13109 | 11668 | 13109 | 13381 | 10,77 | 97,97 |
| 12522 | 8921 | 12522 | 13630 | 26,42 | 91,87 |
| 12100 | 9565 | 12100 | 13631 | 18,60 | 88,77 |

**Tabela II - 11** . Viabilidade do biofilme multiespécies – Área Viva, Morta e Total do biofilme (um²) e o Percentual das Áreas (%), após imersão no higienizador NitrAdine.

| Área Verde (um²) | Área Vermelha (um²) | Área Total do biofilme (um²) | Área Total da Imagem (um²) | Área Viva/ Área Total imagem (%) | Área do Biofilme/ Área Total da imagem (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 10941 | 9768 | 10941 | 13630 | 8,61 | 80,27 |
| 10881 | 8264 | 10881 | 13822 | 18,93 | 78,72 |
| 11205 | 8186 | 11205 | 13822 | 21,84 | 81,07 |
| 11142 | 7029 | 11142 | 13822 | 29,76 | 80,61 |
| 10462 | 6466 | 10462 | 14216 | 28,11 | 73,59 |
| 10679 | 7609 | 10679 | 13919 | 22,06 | 76,72 |
| 9287 | 8561 | 9287 | 13886 | 5,23 | 66,88 |
| 11629 | 7260 | 11629 | 13919 | 31,39 | 83,55 |
| 9534 | 9534 | 9534 | 14017 | 0,00 | 68,02 |
| 11734 | 9231 | 11734 | 13631 | 18,36 | 86,08 |
| 9145 | 9145 | 9145 | 13631 | 0,00 | 67,09 |
| 10873 | 8078 | 10873 | 13919 | 20,08 | 78,12 |
| 13033 | 7278 | 13033 | 13822 | 41,64 | 94,29 |
| 12057 | 12057 | 12057 | 13259 | 0,00 | 90,93 |
| 11219 | 10493 | 11219 | 13630 | 5,33 | 82,31 |
| 10230 | 10230 | 10230 | 13870 | 0,00 | 73,76 |
| 6482 | 6482 | 6482 | 14017 | 0,00 | 46,24 |
| 12554 | 11174 | 12554 | 14017 | 9,85 | 89,56 |
| 9926 | 8225 | 9926 | 14217 | 11,96 | 69,82 |
| 8055 | 8055 | 8055 | 13887 | 0,00 | 58,00 |

## APÊNDICE III - REVISÃO DE LITERATURA

Diversas metodologias vêm sendo empregadas por meio de estudos in vitro para avaliar a efetividade antimicrobiana dos higienizadores químicos de próteses totais à base de peróxidos alcalinos frente aos diferentes potenciais patogênicos dos biofilmes.

Moore, Smith e Kenny (1984) compararam a eficácia de oito produtos de limpeza de próteses totais quanto à eliminação de microrganismos aeróbicos, anaeróbicos e leveduras. Na primeira parte do estudo foi avaliada a eficácia dos seguintes higienizadores de prótese, frente à cultura de *C.albicans:* Denalan, Efferdent, Polident; Mersene, Clorox-Calgon e Miller's. Diluições seriadas, obtidas a partir de culturas de *C. albicans* foram tratadas com os higienizadores, sendo que os produtos foram testados nas concentrações de um quarto, meio e na concentração recomenda pelo fabricante. Amostras foram coletadas após 15, 30 e 60 minutos de exposição aos higienizadores. Diluições seriadas obtidas a partir dessas amostras foram semeadas em Agar dextrose Sabouroud e incubadas por 72 horas em temperatura ambiente. Após contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), os resultados mostraram que os higienizadores Mersene, Clorox-Calgon e o Miller’s tiveram a mesma ação antifúngica nas diferentes concentrações e tempos avaliados. O Efferdent, o Polident e o Denalan foram os menos eficazes. Na segunda parte do estudo foi avaliada a eficácia dos higienizadores (Mersene, Polident, Kleenite, Clorox-Calgon e escovação com sabão Ivory) na remoção de microrganismos presentes nas próteses de 12 pacientes. Os pacientes foram instruídos a usar as próteses como de rotina e armazená-las em água quando não estivessem sendo usadas e a não utilizar nenhum higienizador abrasivo ou químico. As próteses foram distribuídas nos grupos: Grupo 1) Higienizadores de imersão ( 30 minutos), Grupo 2) Escovação com Água e Sabão (60 segundos) e Grupo 3) Imersão em Água destilada (Controle - 30 minutos). Após os procedimentos de higienização, cada prótese foi imersa em solução salina, por 10 segundo, para remoção de resíduos químicos e em seguida foram obtidas diluições de cada amostra, as quais foram semeadas e incubadas. Os resultados mostraram que o Miller’s e o Kleenite foram os mais eficazes. O Clorox-Calgon foi efetivo na remoção das leveduras em condições laboratoriais, mas não foi efetivo nas condições clínicas. Os autores concluíram que os higienizadores de prótese devem ser efetivos

na sanitização dos aparelhos protéticos e não somente eficazes na remoção de manchas e depósitos.

Nakamoto et al. (1991) avaliaram a afetividade de higienizadores de próteses a base de peróxidos alcalinos (com e sem enzimas) frente a *Candida albicans* (cepas padrão). As soluções higienizadoras foram avaliadas quanto à capacidade fungicida e de remoção da *C. albicans* aderida à resina acrílica. Foram utilizados 01 higienizador sem enzimas (Polident), 01 com enzimas líticas das leveduras e enzimas proteolíticas (Pika) e 03 com enzimas proteolíticas (Liodent, Dr. Health e Polident). Soluções fúngicas foram preparadas, diluídas (3 X $10^7$ celulas/mL) e empregadas para realização de testes líticos de leveduras, do efeito fungicida e de habilidade de remoção de cepas de *Candida* aderidas à resina acrílica. Os resultados mostraram que todos os higienizadores apresentaram ação lítica; porém, após 120 minutos, o higienizador Polident (com enzimas) apresentou a melhor ação. Quanto ao teste fungicida, todos os higienizadores eliminaram as cepas de *C. albicans* em período de tempo de 5 a 30 minutos, exceto o higienizador Pika. Quanto à habilidade de remoção de Candida, embora os cinco higienizadores tenham apresentado ação, os melhores resultados foram registrados para os higienizadores com enzimas, com melhores resultados para o higienizador Dr. Health. Os autores concluíram que a afetividade foi mais dependente do peróxido alcalino do que das enzimas.

Drake et al. (1992) avaliaram a eficácia de higienizadores de imersão de prótese contra *C. albicans* e *S. mutans*. Corpos de prova retangulares (15 x 25 mm) foram obtidos a partir da bases de próteses. As espécies de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* foram semeadas em Sabouraud a 37ºC, em condições aeróbicas durante 24 horas e em TSB-YE (5% de $CO_2$) a 37ºC durante 24 horas, respectivamente. Em seguida, os corpos de prova foram contaminados e higienizados: 1) Pastilha efervescente à base de peróxido alcalino (Efferdent-12 minutos), 2) Pastilha efervescente à base de peróxido alcalino (Polident-12 minutos). Em seguida foram lavadas em água destilada estéril. Amostras das superfícies de cada corpo de prova foram coletadas, colocadas em PBS estéril e sonificadas por 10 segundos, para obtenção das diluições. Em seguida, as diluições foram semeadas em Agar TS2OB (5% de $CO_2$) por 48 horas e em Agar Saboraud, em condições aeróbicas, por 24 horas. Os resultados mostraram que tanto o Efferdent, como o

Polident, foram efetivos na redução da aderência de *S.mutans* e ambos os higienizadores foram ineficazes contra *C.albicans*.

Nikawa et al. (1995) avaliaram a atividade antifúngica de 11 higienizadores de próteses totais sobre o biofilme de *Candida albicans*, assim como avaliaram a compatibilidade desses higienizadores com condicionadores teciduais. Foram empregados 11 higienizadores (Denture Cleanser Tablets, Efterdent, 2-layered Efterdent, Kleenite, Pika, Double Action Polident, Polident for Partials, Super Strength Polident, Polident Powder, Smoker's Polident e Stain Away) e 6 condicionadores teciduais (Coe Comfort, Coe Soft, Fit Softer, GC Soft Liner, Hydrocast e Visoogel). Os resultados mostraram que todos os higienizadores reduziram a viabilidade fúngica, com melhores resultados para o Super Strength Polident. Todos os higienizadores também reduziram a atividade antifúngica, com melhores resultados para kleenite, Polident for Partials, Efferdent, Denture Cleanser Tablet e Super Strength Polident. Os autores concluíram que as alterações nos condicionadores teciduais variaram de acordo com o período de imersão, higienizador e condicionador empregados.

Coenye et al. (2008) investigaram a efetividade de um sistema in vitro de formação de biofilmes (Dispositivo de Robbins modificado - MRD) em materiais frequentemente utilizados na fabricação de aparelhos orais, como dentaduras, aparelhos ortodônticos, protetores bucais ou aparelhos auditivos. Além disso, avaliaram a eficácia de um novo higienizador à base de peróxido alcalino (Medical Interporous) na remoção de biofilmes microbianos. O sistema foi empregado para a avaliação da formação de biofilmes de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus resistentes* à meticilina (*MRSA)* e *P. aeruginosa* sobre amostras circulares (2mm de altura, 6,8 mm de diâmetro e área superficial de 36 $mm^2$) confeccionadas de substratos de poli metil-metacrilato (PMMA), silicone de uso médico, hidroxiapatita e elastômero. Após a formação de biofilme, as amostras foram tratadas com 04 higienizadores à base de peróxido alcalino: 1) NitrAdine$^{TM}$ (Medical Interporous – 15 minutos); 2) Polident (GlaxoSmithKline); 3) Steradent (Reckitt & Benckiser); e 4) Efferdent Plus (Pfizer). Todos os produtos foram utilizados de acordo com o as instruções do fabricante. O grupo controle foi tratado com água. Após o tratamento, as amostras foram transferidas para tubos com solução de NaCl e submetidos a 3 ciclos de 30 segundos com ultra-som e à agitação em vórtex por 30 segundos para remoção das células fracamente aderidas. Após

obtenção das diluições, estas foram semeadas em Sabouraud Dextrose Aga(SDA) para *C. albicans*, Brain Heart Infusion (BHI) para *S. mutans* e Tryptic soy Agar (TSA) para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As placas foram incubadas a 37ºC por 24 horas, o número de colônias foi contado e as Unidades Formadoras de Colônias calculadas. Todos os experimentos foram conduzidos em pelo menos 03 amostras. Além disso, o biofilme de *C. albicans* foi avaliado por meio de microscopia de fluorescência (Olympus GmbH) e de varredura (Nikon) e o número de células planctônicas após o uso do NitrAdineTM foi mensurado. Os resultados mostraram que o sistema foi eficaz, resultando na formação de uma massa densa e madura de biofilme, independentemente do microrganismo ou do substrato empregados. O higienizador NitrAdine TM foi eficaz na remoção de todos os biofilmes, apresentando efetividade contra *C. albicans* em todos os substrato avaliados. O Polident, Efferdent,e Steradent apresentaram menor efetividade, principalmente para biofilmes de *C. albicans* formado em PMMA. Os autores verificaram também que a diminuição da temperatura e o aumento do volume de água e do tempo de exposição reduzem a eficácia dos higienizadores, ressaltando a necessidade do seguimento das instruções dos fabricantes.

Silva et al. (2008) avaliaram a eficácia de higienizadores de próteses (hipoclorito de sódio a 1%, digluconato de clorexidina a 2%, glutaraldeído a 2%, vinagre a 100%, pastilhas efervescentes à base de perborato de sódio e perborato de sódio a 3,8%) na desinfecção de espécimes de resina acrílica (Jet) contaminados por *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus, E. coli*e e *B. subtilis,* por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). O grupo controle era constituído de espécimes contaminados que não haviam sido submetidos à desinfecção. Cada um dos 350 espécimes foi transferido para um tubo de ensaio contendo meio de cultura (Tripticsoy ou Sabouroud) inoculado com a suspensão de cada microrganismo. Após incubação, os espécimes foram imersos nas soluções higienizadoras por 10 minutos e posteriormente em solução salina para desprendimento das células fracamente aderidas. Diluições decimais seriadas ($10^0$ a $10^{-3}$) foram realizadas a partir dessas soluções resultantes e, em seguida, semeadas em placas de petri contendo meios de cultura específicos (Tripticsoy ou Sabouraud). Após o período de incubação, o número de Unidades Formadoras de Colônias foi contado. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio a 1%, a clorexidina a 2% e o glutaraldeído a 2% foram os métodos mais eficazes contra todos os microrganismos testados, seguidos pelo vinagre a 100%,

o perborato de sódio a 3,8% e as pastilhas efervescentes à base de perborato de sódio.O perborato de sódio a 3,8% foi mais efetivo que as pastilhas efervescentes à base de peróxido tanto contra *C.albicans* como para *S.mutans.* A rugosidade superficial aumentou após desinfecção com perborato de sódio a 3,8%. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio a 1%, o glutaraldeído a 2%, a clorexidina a 2% e o perborato de sódio a 3,8% consistem em alternativas válidas para a desinfecção da resina acrílica.

Ferreira et al. (2009) verificaram a eficácia de higienizadores frente à aderência da *Candida albicans* e *Candida glabrata* sobre reembasadores de próteses. Verificaram também a correlação entre rugosidade de superfície e níveis de aderência microbiana. Foram selecionados três materiais: reembasadores à base de polimetil metacrilato macio (CoeSoft) e duro (Kooliner); e reembasador à base de silicone macio (Ufi gepl P). As amostras foram preparadas de acordo com as orientações dos fabricantes e tiveram suas rugosidades superficiais medidas (Perfilômetro Surfcorder SE 1700). Para simular as condições clínicas, cada amostra recebeu uma película de revestimento salivar obtida de um voluntário saudável. Em seguida, as amostras foram colocadas em tubos contendo 10 mL de Sabouraud broth (Difco) e suspensões de *C. albicans* e *C. glabrata.* Após a inoculação, os tudos contendo as amostras foram incubados por 2 h a 37ºC e, em seguida, lavados com PBS (15 segundos) e distribuídas aleatoriamente em quatro grupos: T1: água destilada por 15 minutos (controle negativo), T2: solução higienizadora enzimática (Polident 3 minutes) por 3 minutos, T3: solução higienizadora (Efferdent) por 15 minutos; ou T4: solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 10 minutos (T4). Os tabletes efervescente foram imersos em 30mL de água destilada deionizada a 40ºC. Após os procedimentos, as amostras foram lavada em PBS, fixadas com cristal violeta durante 1 minuto, enxaguadas com PBS e as células fúngicas aderidas foram contadas por meio de um microscópio óptico (Axiostar 2 Plus) (x400), sendo os resultados expressos em células/mm$^2$. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significante da rugosidade da superfície entre CoeSoft e o Kooliner. O Ufi gepl P apresentou a superfície mais lisa. Células de *C. albicans* e *C. glabrata* foram encontradas sobre os materiais após os tratamentos. O CoeSoft apresentou o maior número de células aderidas quando comparado com o Kooliner. A colonização geral em todos os materiais diminuiu significativamente com o tratamento com NaOCl 0,5%. Todos os outros tratamentos apresentaram a mesma quantidade de células quando comparados com o grupo controle para ambas as

espécies de Candida. O número de células de *C. glabrata* foi maior para todos os tratamentos, exceto para o NaOCl a 0,5%, em comparação com *C. albicans*. Não houve correlação entre a rugosidade da superfície e adesão de *C. glabrata* e *C. albicans* em todos os substratos .

Gedik et al. (2009) avaliaram a eficácia de higienizadores de próteses na desinfecção de forradores resilientes, bem como a rugosidade de superfície e a capacidade de adesão de *Candida albicans* desses materiais. Cinquenta e seis espécimes foram preparados para cada um dos materiais testados: Mollosil, Soft-Liner; Moloplast B e Luci Soft. Após a medição da rugosidade de superfície inicial dos espécimes, estes foram contaminados com suspensão de *C.albicans* e incubados a 37ºC por 90 minutos. Em seguida, foram lavados com PBS e imersos, por 120 minutos, em 40 mL de solução de cada um dos sete higienizadores de próteses: Peróxidos Alcalinos (Efferdent, Polident, Steradent e Corega), Ácido clorídrico a 6,5 % (Denclen), Gluconato de Clorexidina 0,12% (Klorhex) e Hipoclorito Alcalino 5,25% (Axion). Em seguida, cada espécime foi lavado em PBS, fixado com formaldeído e o número de células de *C. albicans* que aderiram à superfície de cada espécime foi contada por meio de um microscópio, sendo expresso pela proporção de células remanescentes após a exposição a cada higienizador em comparação ao grupo controle (água destilada esterilizada). Os resultados mostraram que não houve relação entre o tipo de polimerização do material e a capacidade de adesão de *C. albicans*, pois não houve diferença significativa entre os valores de rugosidade médias das superfícies dos materiais. Todos os higienizadores foram eficazes na remoção de *Candida,* apesar de não prevenirem a adesão de *Candida*. Embora nenhuma diferença tenha sido observada entre os higienizadores, os autores consideraram que o hipoclorito alcalino Axion foi o desinfetante mais eficaz; e que os produtos Corega, Polident, Denclen, Steradent e Efferdent obtiveram os melhores resultados em relação à limpeza dos espécimes.

Lee et al. (2009) avaliaram a eficácia de higienizadores frente à erradicação de biofilmes planctônicos, recentemente aderidos, estabelecidos e maduros de *Staphylococcus aureus resistentes* à meticilina (MRSA-15 e MRSA-16) em corpos de prova de resina acrílica. Foram empregados 03 higienizadores: Solução de hipoclorito de sódio a 2% (Soçução de Milton); Solução desinfetante 2% isenta de aldeído e com liberação de oxigênio (Perform) e Solução 1.5% de solução de peróxido alcalino (Steradent). Inicialmente, foi determinada a Concentração Inibitória

Mínima dos agentes antimicrobianos. O biofilme artificial foi formado sobre espécimes de resina acrílica (Rapid Repair) com o auxílio de um dispositivo de formação de biofilmes (Constant Deplh Film Fermenter-CDFF). Foram analisados os biofilmes de 04 fases: planctônico, séssil (4 horas), estabelecido (24 horas) e maduro (120 horas). Os espécimes foram retirados após 4, 24 e 120 horas de formação de biofilme e imersos (imersões curtas) em cada agente antimicrobiano ou em solução salina (controle) por 1, 5 ou 10 minutos. Em seguida colocados em solução tampão e agitado por um minuto para obtenção das diluições seriadas, as quais foram semeadas em BD Columbia Agar e incubadas por 24 horas. Após esse período, as colônias foram contadas e a porcentagem de células viáveis calculada. As amostras também foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura (Zeiss). Os resultados da CIM mostraram que o NaOCl foi o mais efetivo com CIM de 0.03%, Perform com 0.12% e Steradent com 0.38% (MRSA-16) e 0.09% (MRSA-15). Os higienizadores foram efetivos contra MRSA em biofilme de 4 horas, com o hipoclorito a 2% sendo efetivo com exposição de 1 minuto. Os biofilmes de 24 e 120 horas foram mais resistentes à ação dos higienizadores, com o Steradent e Perform sendo menos eficazes; porém, o hipoclorito a 2% apresentou efetividade com apenas 1 minuto de imersão para todos os biofilmes formados. O Steradent foi o higienizador menos eficaz. Os autores concluíram que os biofilmes de MRSA (120h) são difíceis de erradicar, e que o único higienizador capaz de erradicar todos os biofilmes de MRSA-15 e 16 foi o hipoclorito a 2%. Os autores salientaram que a falta ou inadequada higienização podem ser prejudiciais à saúde do paciente, pois podem ser fonte de reinfecção, principalmente em pacientes idosos e hospitalizados.

Montagner et al. (2009) estudaram a ação antifúngica de diferentes agentes de limpeza sobre espécimes de resina acrílica (Vipi Wave) polimerizadas por micro-ondas, sem polimento e previamente inoculados com *Candida albicans.* Sessenta espécimes (10x10x5mm) foram inoculados com a cepa de *C. albicans* e incubados por 3 horas a 37ºC. Os espécimes foram distribuídos em 05 grupos experimentais e dois grupos controles: G1: clorexidina a 2,0% (10 minutos); G2: hipoclorito de sódio a 0,5% (10 minutos); G3: hipoclorito de sódio modificado (hipoclorito de sódio 0,5% e álcool 96ºGL - 10 minutos); G4: peróxido alcalino Corega Tabs (5 minutos); G5: peróxido de hidrogênio 10v (30 minutos); C1: controle inoculado com *C. albicans* e imerso em solução salina (10 minutos) e C2: espécimes controle com ausência de

inoculação, imerso em solução salina (10 minutos). Em seguida, cada espécime foi lavada com salina e transferida para tubos de ensaio contendo 5 mL de BHI broth e neutralizadores e incubados por 24 horas. Após esse período os tubos foram avaliados por meio de um espectrofotômetro. Alíquotas de cada tubo foram coletadas, inoculada em meio Sabourud Agar e incubadas a 37ºC por 24 horas, para verificar o crescimento microbiano. Os resultados mostraram que somente o hipoclorito de sódio e o peróxido de hidrogênio a 10% apresentaram ação antifúngica contra *C. albicans*. O Corega Tabs, usado de acordo com as recomendações do fabricante, não foi eficaz na remoção da *C.albicans*. A solução de clorexidina a 2% não inibiu o crescimento dos microrganismos mesmo após 10 minutos de imersão. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio e o peróxido de hidrogênio são mais eficientes frente à *C.albicans* do que a solução de clorexidina a 2% e agentes efervescentes.

Paranhos et al. (2009) realizaram um estudo com objetivo de comparar a eficácia de três métodos de higienização de próteses totais (químico, mecânico e associado) e os efeitos sobre diferentes microrganismos presentes em biofilmes formados em superfície de resina acrílica termicamente ativada. Foram confeccionados 220 corpos de prova (15 mm diâmetro e 4mm de largura) de resina acrílica (Vipi Dental Ltda) a partir de um padrão de cera. As amostras foram esterilizadas com gás de óxido de etileno para posterior contaminação com inóculo microbiano com $10^6$ UFC/mL. A contaminação foi realizada a $37^{O}$C durante 48h, para as espécies: cepas padrão (*Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Escherichia coli, Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis*) e cepas de campo *(S. mutans, C. albicans, Candida glabrata e Candida tropicalis*). Após a incubação e contaminação, as amostras foram aleatoriamente distribuídas nos seguintes grupos: 1) Método químico: imersão em container com 200 mL de água destilada a $37^{O}$C e um tablete efervescente de peróxido alcalino (Bonyplus Tablets) durante 5 minutos; 2) Método mecânico: escovação com escovas dentais de cerdas macias (TEK – Johnson & Johnson) e dentifrício para dentadura (Dentu Creme) por 20 segundos, e posterior imersão em água destilada durante 5 minutos; 3) Método associado: higienização pelo método mecânico e, em seguida, pelo método químico; 4) Controle Negativo: sem contaminação e posterior imersão em água destilada e esterilizada (200,0 mL) durante 5 minutos e 5) Controle positivo: contaminação e posterior imersão em água destilada e esterilizada (200,0

mL) durante 5 minutos. Os resultaram mostraram que não houve diferença significativa entre os métodos para as cepas de *S. mutans* (padrão e experimental), S. *aureus* e *P. aeruginosa*. Já para *E. faecalis*, *C. albicans* (padrão e experimental) e *C. glabrata* houve efetividade dos métodos mecânico e combinado. Para *E. coli* e *C. tropicalis*, a combinação dos métodos foi mais eficaz que o método mecânico. O método combinado apresentou resultados semelhantes ao método mecânico e foi mais efetivo que o químico na maioria das espécies avaliadas (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* (padrão e campo), *Candida glabrata* e *Candida tropicallis*). Com base nos resultados, os autores concluíram que a eficácia de cada um dos métodos de higienização testados depende do tipo de biofilme microbiano formado.

Souza et al. (2009) avaliaram o efeito do bicarbonato de sódio a 5% na adesão de *Candida albicans* à resina acrílica termicamente ativada. Cinquenta espécimes (4 $mm^2$) de resina acrílica (Artigos Odontológicos Clássico Ltda) foram obtidos utilizando uma matriz metálica. As amostras foram polidas quimicamente (Termotron PQ- 9000), esterilizados em autoclave (121°C/15 min) e, em seguida, foram imersos em Sabouraud e inoculados com suspensão de células de *Candida albicans* (ATCC 1880). Após 24 horas de inoculação a 37°C, os espécimes foram distribuidos em quatro grupos e imersos durante 10 minutos em: bicarbonato de sódio 5% (Labsynth), gluconato de clorexidina o,12% (Periogard), vinagre branco (Castelo Alimentos) e peróxido alcalino (Corega Tabs). Um grupo de controle foi incluído, no qual foi utilizado água destilada. Após os tratamentos, os espécimes foram enxaguados com água destilada esterilizada e colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução salina (0,85%) e agitados durante 60 segundos para obtenções das diluições. As diluições foram semadas em Agar Sabouraud dextrose (Difco Labs), incubados a 37ºC durante 48 horas e o número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por espécime foi contado. Os resultados mostraram que apenas o gluconato de clorexidina a 0,12% e bicarbonato de sódio a 5% reduziram o número de UFC/mL , apresentando diferença significativa em comparação com o grupo controle. Os autores concluíram que o gluconato de clorexidina 0,12% foi mais eficaz na redução da adesão de *Candida albicans* à resina acrílica ativada termicamente, entretanto, o bicarbonato de sódio 5% também pode ser uma alternativa viável.

Fernandes et al. (2010) avaliaram a eficácia de higienizadores de próteses sobre o biofilme de *Candida* e biofilme multiespécies de *C. glabrata* e *C. albicans* em resina polimetil metacrilato polimerizada por micro-ondas e convencional. As variáveis do estudo foram o ângulo de contato, a energia livre de superfície e o número de unidades formadoras de colônia de *C. albicans* e *C. glabrata*. Corpos de prova cilíndricos (10mm de diâmetro e 2mm de espessura) foram confecionados com polimetil metacrilato polimerizado por micro-ondas (Acron MC) e resina poliamida termoplástica (Fexite MP). Sequencialmente, a rugosidade superficial dos corpos de prova foi medida (rugosímetro Surfcorder SE1700), sendo padronizada, para ambas as resinas, em 0,34 ± 0,2µm. Em seguida, os corpos de prova foram limpos em ultra-som (Thornton T740) com água esterilizada durante 10 minutos antes da medição de energia livre de superfície. Foram empregados três líquidos para medição do ângulo de contato: água destilada, formamide e 1-bromonaphthalene. O ângulo de contato (9 graus) foi medido por meio da dispersão de uma gota de cada líquido (10 µl) sobre a superfície de cada espécime. As imagens das gotículas foram capturadas imediatamente e os ângulos de contacto foram medidos (AutoCAD Release 14). A energia livre de superfície (MN · m-1) foi calculada usando o cosseno dos valores de ângulo de contato obtidos previamente à formação de biofilmes de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. glabrata* (ATCC 2001) e ambas as leveduras. Os corpos de prova foram cobertos por saliva e incubados por 30 minutos a 37º C. Após a contaminação dos corpos de prova e formação de biofilme por 72 horas, estes foram tratados (n=8) com: água destilada (controle negativo – 10 minutos), soluções enzimática (Polident por 3 minutos), solução higienizadora (Corega Tabs por 5 minutos), hipoclorito de sódio a 0,5% (10 minutos – controle positivo). Após os tratamentos cada corpo de prova foi transferido para um tubo de ensaio com 3 mL de PBS esterilizado e sonificado (7W) por 30 segundos para obtenção de diluições seriadas que foram semeadas em CHROMAgar Candida e Agar sangue. Em seguida, foram incubadas a 37ºC por 24-72 horas. As Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas utilizando esteriomicroscópio (Coleman) e os resultados expressos em UCF/mL. A energia livre de superfície da PMMA (37,16) foi significativamente maior que da resina poliamida (36,35). Ambos os biofilmes (simples e composto) apresentaram maior crescimento na resina poliamida. A contagem do biofilme simples de *C. glabrata* foi maior que *C. albicans* para todos os tratamentos; porém, não houve diferença entre o biofilme composto

com nenhum dos dois biofilmes simples. Os higienizadores foram capazes de diminuir os níveis de Candida, porém o hipoclorito a 0,5% foi o único agente efetivo eliminando todos os microrganismos. Os higienizadores causaram maior redução de *C. albicans* do que *C. glabrata* no biofilme composto. Os autores concluíram que ambos os higienizadores (com ou sem enzimas) foram efetivos no controle do biofilme de *Candida spp*, especialmente na redução de *C. albicans*, porém não foram capazes de eliminar totalmente as células de *Candida* dos materiais estudados, como o hipoclorito de sódio a 0,5%.

Jose et al. (2010) investigaram a capacidade de quatro higienizadores de prótese em descontaminar e esterilizar superfícies cobertas por biofilme de *Candida albicans*. Dezesseis cepas de *C. albicans* foram isoladas de pacientes com estomatite e uma cepa padrão (ATCC 90028) foram armazenadas em ágar dextrose Sabouraud a 4ºC. Uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio específico e cultivada em placas de 96 poços durante toda a noite (30ºC ) sob agitação em estufa bacteriológica. Em seguida, foram imersas nos higienizadores de prótese: Boots Smile (peróxido alcalino - 15munitos), Medical Interporous (peróxido alcalino - 15 minutos), Steradent Active Plus (peróxido alcalino - 10 minutos) e Dentural (hipoclorito de sódio a 1,5% - 20 minutos), seguindo as instruções do fabricante ou por 18 horas (*overnight)*. Foram quantificadas a atividade metabólica do biofilme e a biomassa do biofilme. A MEV foi empregada para exame do biofilme. Os resultados foram obtidos pelo teste de XTT e análise de microscopia eletrônica de varredura. O higienizador Dentural foi o mais eficaz, reduzindo a biomassa em mais de 90% após 20 minutos. O Steradent Active plus foi significativamente mais eficaz em 10 minutos do que na imersão overnight. Todos os higienizadores reduziram a atividade metabólica em mais de 80% após a imersão durante a noite. O Boots Smile reduziu a atividade metabólica em apenas 15 minutos de imersão. O MEV revelou presença *C. albicans* após o tratamento com higienizador Dentural. O higienizador Medical Interporous TM promoveu redução de 80% a 75% após 15 minutos e 18 horas, respectivamente. Os autores concluíram que os higienizadores de prótese são efetivos contra *C. albicans,* tanto em termos de remoção, como de desinfecção; no entanto, a retenção de biofilme residual que poderia conduzir à recolonização foi observada. Os higienizadores de prótese usados foram capazes de reduzir o biofilme de *C. albicans* in vitro; no entanto, nenhum dos produtos testados foi eficaz

na eliminação total de biofilmes de *C. albicans.* Segundo os autores, os métodos mecânicos alternativos são necessários para melhorar a remoção do biofilme.

Li et al. (2010) avaliaram a eficácia de tratamentos antimicrobianos em várias superfícies de materiais dentários. Foram confeccionadas espécimes: de hidroxiapatita (HiMed), resina acrílica (Lucitone) e porcelana (Dentsplay). Todas as amostras foram esterilizadas com etanol a 95% e ultravioleta. Foram coletadas saliva não estimulada de pessoas que não limparam os dentes por mais de 6 h. Esta saliva foi preparada, centrifugada e semeadas. Foram avaliados biofilmes de *S. mutans*, de *C. albicans* e biofilme multiesipécies (bactérias salivares e *C. albicans*). Os espécimes foram contaminados e incubados por 20 horas em condições anaeróbicas a 37 º C, para *S. mutans* e *C.albicans*/saliva, e em condições aeróbicas para biofilmes de *C.albicans* (única espécie). Em seguida, foram submetidos ao tratamento com Polident (peróxido alcalino – 5 minutos) e enxaguados com PBS. Após obtenção das diluições, estas foram semeadas em meios específicos. Os controles foram tratados com PBS. O crescimento dos biofilmes foi examinado por microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss, Jena, Alemanha) e a efetividade do tratamento com Polident pela viabilidade de Unidades Formadoras de Colônias. Os resultados mostraram que o biofilme de *Candida albicans,* de *S. mutans*, e o biofilme multiespécies cresceram nos diferentes materiais avaliados. A formação de biofilme de *C. albicans* em hidroxiapatita foi reduzida quando comparada com outros materiais, incluindo a resina acrílica. A eficácia dos tratamentos variou significativamente, dependendo do tipo de superfície. Biofilmes de uma única espécie formados em superfícies de poliestireno exibiram maior susceptibilidade ao tratamento. Os autores concluíram que o Polident foi eficaz na manutenção da higiene das próteses e que a natureza da superfície influencia algumas características do biofilme, como o acúmulo de biomassa e susceptibilidade aos tratamentos antimicrobianos.

Vieira et al. (2010) estudaram a eficácia de higienizadores de próteses em relação à recolonização do biofilme por *Candida spp.* formado na superfície de reembasadores. Biofilmes de *C. albicans (*ATCC 90028) ou *C. glabrata* (ATCC 2001) foram formados sobre a superfície de espécimes de reembasadores e incubados por 48 h. Em seguida, foram submetidos aleatoriamente a um dos seguintes tratamentos: peróxido alcalino com enzima (Polident 3-minutos), peróxido alcalino (Efferdent,- 15 minutos), hipoclorito de sódio a 0,5% (10 minutos) e água destilada

(15 minutos). Após os tratamentos, o biofilme dos espécimes foi desprendido por sonificação (7W – 30 segundos). As diluições obtidas a partir das soluções sonificadas foram semeadas e incubadas a 37ºC por um período de 24-48h, em condições aeróbicas. As células residuais foram contadas por meio de um microscópio estereoscópico (Coleman Comp. Imp) e o resultado foi expresso em células/mL. Os espécimes foram enxaguados em PBS estéril e analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM5600LV). Os resultados mostraram que o tratamento com os peróxidos alcalinos foi melhor que o controle; entretanto, não foi efetivo na remoção de Candida e na prevenção da recolonização de biofilme. O hipoclorito de sódio foi o único tratamento que removeu efetivamente o biofilme, visto que nenhuma célula viável foi encontrada após seu uso. Os autores concluíram que os higienizadores de próteses à base de peróxidos alcalinos não foram eficazes na remoção e prevenção da recolonização de biofilmes de *Candida spp.*

Iseri et al. (2011) avaliaram a eficácia de diferentes agentes de limpeza na adesão de *Candida albicans* à resina acrílica. Culturas de *C.albicans* foram inoculadas em 2 mL de Agar Dextrose Sabouraud (SDA) e incubadas a 37ºC por 24 horas. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos (3000 rpm), lavadas em PBS, e diluídas para obtenção de uma suspensão de $10^6$ células de C. albicans/mL. Os 180 espécimes de resina acrílica (10x10x2mm) foram contaminados com a suspensão, incubados a 37 º C durante 90 minutos e distribuídos nos grupos (n=30): Polident (peróxido alcalino), Efferdente (peróxido alcalino), Fittydent (peróxido alcalino), CloSYSII (Dióxido de Cloro) e Corsodyl (Gluconato de Clorexidina 0,2% ) Os corpos de prova foram imersos em 40 mL de cada higienizador a 37 º C durante 15, 30 e 60 minutos. As células fúngicas aderidas a superfícies de resina acrílica foram fixados em formaldeído e contadas por meio de um microscópico óptico. Os resultados mostraram que as soluções CloSYS e Corsodyl foram mais eficazes na remoção de *C. albicans* para todos os tempos de tratamento. Todos os peróxidos alcalinos reduziram o número de colônias de *C. albicans*, mas nenhum conseguiu eliminá-la completamente. A redução significativa do número de *C. albicans* no presente estudo sugere que o uso de enxaguatórios bucais pode ser um método adequado para a limpeza de próteses.

Lee et al. (2011) avaliaram a eficiência de seis métodos de limpeza de prótese diferentes para remoção de Candida albicans. Foram confeccionados 140

espécimes (40 x 12 x 3 mm) de resina acrílica (Lucitone 199) de acordo com as instruções do fabricante e esterilizados com óxido de etileno. Cada espécime foi colocado em tubos de ensaio com 6 mL de suspensão de *C. albicans* (6-7 x 107 cfu/mL) e incubado por 2h a 37ºC. Após a contaminação os espécimes foram higienizados de acordo com os métodos (n=20): 1) escovação com escova macia (Colgate Extra Clean) e enxague em água destilada; 2) Imersão em Polident (Peróxido alcalino – 15 minutos); 3) Associação método 2 com 1; 4) Imersão em Gluconato de Clorexidina 0,12% (Parmason Shining – 15 minutos); 5) Irradiação de UV (ADH Health Products – 10 minutos); 6) Imersão em água destilada esterelizada (15 minutos) e 7) Controle (sem tratamento).Em seguida, foram lavados e colocados em 1 mL de Sabouraud dextrose broth por 10 minutos e posteriormente agitados durante 30 segundos. Diluições seriadas foram semeadas em Ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37ºC por 24 horas e, em seguida, o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi contado. Os resultados mostraram que o método combinado (escova de dentes e imersão Polident) foi mais eficaz na redução do crescimento de *C. albicans*. Todos os métodos foram significativamente diferentes do grupo controle. O grupo controle apresentou a maior contagem de colônias de *C. albicans* e a imersão em água destilada e esterilizada foi ineficaz na remoção de *C. albicans*. O método mecânico, o Polident e associação entre eles foram mais eficazes que o gluconato de clorexidina a 0,12% e a irradiação com luz UV. Os autores concluíram que a imersão em pastilhas efervescentes, a escovação e associação entre ambos os métodos reduziram significativamente a aderência de *C.albicans* à resina acrílica.

Dhamande et al. (2012) compararam a capacidade de remoção de biofilme de Candida de 3 higienizadores de próteses totais. Foram confeccionados 120 corpos de prova (1,5mm x 1,5mm x1,5mm) em resina acrílica a partir de matrizes metálicas. Em seguida, os corpos de prova foram contaminados com suspensão de $3x10^7$ células de *C.albicans*/mL e incubados a 37ºC, por 2h em seguida, foram acrescentado 2mL de Sabouround em cada poço da placa de cultura e incubados por 6 dias (144h). Os corpos de prova foram imersos nas seguintes soluções higienizadoras, por 8 horas (n=30/grupo): Viclean Power (D1- Hipoclorito de sódio), Clinsodent Power (D2- peróxido alcalino) e Fittydent Tablets (D3 – peróxido) e o número de colônias foi contado. Em uma segunda análise do estudo, a partir de pré-culturas de *C.albicans* uma suspensão de $3x10^7$ células /mL foi obtida. Para cada 5

mL da suspensão, foi adicionado 5 mL de solução higienizadora em um tubo de ensaio. Esses tubos foram incubados a 37ºC por 5, 30, 60, 90 e 120 minutos. A densidade óptica de cada solução (suspensão-solução higienizadora) foi avaliada por um fotocolorímetro. Como resultado, observaram uma diminuição de UFC após a imersão das amostras em todas as soluções higienizadoras. A densidade óptica diminuiu para todas as amostras, o que significou uma diminuição de células de *C.albicans* devido a ação dos higienizadores. Entre os higienizadores, o Viclean Powder e o Clinsodent Powerd apresentaram maior diminuição da densidade quando comparados ao Fittydent. Os autores concluíram que o higienizador Clinsodent teve maior capacidade de remoção Candida devido presença de Lauril Sulfato de Sódio.

Kumar et al. (2012) testaram a eficácia de dois higienizadores de próteses totais disponíveis no mercado e dois produtos caseiros sobre a adesão de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica Cinquenta espécimes (10 x 10 x 2 mm) de resina acrílica (DPI Heat-Cure Improved) foram confeccionados, esterilizados com luz ultravioleta por 5 minutos e distribuidos em 5 grupos: (1) Clinsodent (peróxido alcalino); (2) Fittydent (peróxido alcalino); (3) vinagre (ácido acético a 4%); (4) vinagre diluído em água (1:2) e (5) água (controle). Após inoculação com *C. albicans,* as amostram foram incubadas por 16 horas a 37ºC e em seguida, foram imersos nos higienizadores e avaliados por 8 horas. Após esse período, os espécimes foram lavados, fixados com metanol e corados com cristal de violeta. As células de *Candida* aderidas foram contadas por meio de microscópio óptico. Todos os higienizadores testados reduziram o número de células de *C. albicans* aderidas; entretanto, os higienizadores de próteses totais disponíveis no mercado (Fittydent e Clinsodent) foram mais efetivos que os produtos domésticos (vinagre e vinagre diluído).

Pellizzaro et al. (2012) analisaram a efetividade da escovação associada a diferentes soluções na eliminação de biofilme de *Candida albicans*. Foram confeccionados 90 espécimes de resina acrílica, os quais foram esterilizados e inoculados com uma suspensão de *C. albicans*. Após incubação, os espécimes foram aleatoriamente distribuídos em 10 grupos, sendo que 5 grupos foram submetidos à escovação mecânica (90 segundos), com água ou agentes de limpeza (água destilada, dentifrício, digluconato de clorexidina a 2%, hipoclorito de sódio a 1% e Polident); 4 grupos foram apenas imersos nos agentes de limpeza (90

segundos) e 1 grupo foi imerso em água destilada (90 segundos - controle). A viabilidade celular foi verificada pelo teste XTT. Todos os grupos submetidos à associação da escovação com os agentes de limpeza apresentaram redução efetiva da viabilidade do biofilme, quando comparados à exposição dos espécimes às soluções. A escovação com clorexidina a 2% e hipoclorito de sódio a 1% reduziram em 100% a viabilidade do biofilme. A imersão nos agentes de limpeza resultou em redução na viabilidade celular, com a clorexidina a 2% sendo a mais efetiva. A utilização de agentes de limpeza em associação ao método de escovação mostrou ser efetivo na remoção do biofilme de *C. albicans*, sendo as soluções de clorexidina e hipoclorito as mais efetivas.

Ramage et al. (2012), compararam a eficácia de remoção de *C.albicans* de protocolos de higienização de prótese. Corpos de prova de 1 $cm^2$ de resina acrílica (Chaperlin/Jacobs Ltda) foram preparados segundo as instruções do fabricante e esterilizados com luz ultravioleta por 15 minuto. Após a inoculação de $1x10^6$ células de *C.albicans* /mL os corpos de prova foram incubados por 4 horas a 37°C e expostos aos seguintes tratamentos higienizadores: (A) Polident – peróxido alcalino – uso diários por 3 minutos, seguindo recomendações do fabricante durante 4 dias ou (B) Polident – Uso intermitente – 1º e 4º dias, e escovação com dentifrício (Colgate Cavity Protection e escova macia Oral B – durante 2 segundos) no 2º e 3º dia. Após cada tratamento os corpos de prova foram transferidos para tubos de ensaio e agitados por 5 minutos em ultrassom. Diluições seriadas foram semeadas e incubadas para contagem das células viáveis após tratamento. Os corpos de prova após os tratamentos foram lavados em PSB, fixados em paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2% e Alciom Blue 0,15% para a análise em microscopia eletrônica de varredura. A inibição da atividade metabólica do biofilme pelo uso dos higienizadores foi determinada usando XTT e a resposta inflamatória do biofilme pelo teste de Elisa. Para esse teste os corpos de prova após higienização foram colocados em culturas de células, por 245 horas a 37ºc e 5% de $CO_2$. Os sobrenadantes das células foram removidos e usados para o teste de Elisa. Os resultados mostraram o tratamento com o Polident inibiu o crescimento de biofilme de *C.albicans* após 4 horas, sendo mais efetivo o tratamento sequencial que o intermitente. O Polident foi mais eficaz que o dentifrício. O teste de Elisa indicou a redução da produção de IL-8, após tratamento com o Polident. Os autores concluíram que a presença de biofilme maduro pode resultar em elevado níveis de

inflamação, o qual pode ser controlado por regimes de tratamento químico diário para a manutenção de uma boa saúde oral.

Lucena-Ferreira et al. (2014) investigaram o efeito da exposição diária a um higienizador sobre biofilme de múltiplas espécies. Corpos de prova cilíndricos (10 × 2 mm) de resina acrílica (QC-20 PMMA; Dentsply) foram confeccionados segundo instruções do fabricante. Os corpos de prova foram polidos de ambos os lados e a rugosidade de superfície padronizada (0,32 ± 0,03). Em seguida, foram lavados com água destilada estéril e com ultra-som para remoção dos resíduos da superfície. A esterilização foi realizada com óxido de etileno. Algumas amostras adicionais foram imersas em meio TSB (Trypticase Soy Broth) em condições aeróbicas durante 48 h, a fim de confirmar a ausência de contaminação microbiana. A eficácia do processo de esterilização foi confirmada pela ausência de turvação média. Um biofilme misto composto por seis microorganismos, sendo cinco bactérias (*Actinomyces naeslundii, Veillonella dispar, Fusobacterium nucleatum,Streptococcus mutans e Streptococcus oralis*) e uma levedura (*Candida albicans*) foi desenvolvido. Todas as cepas foram cultivadas individualmente. Após 15 h de incubação a 37 ° C, alíquotas destas pré-culturas foram transferidas para um novo tubo e incubadas a 37 ° C durante 7 h. Durante a preparação do inóculo, as bactérias foram incubadas em meio anaeróbico e *C. albicans* em condições aeróbicas. Após a maturação do biofilme, os corpos de prova foram distribuídos aleatoriamente em grupos controle (sem tratamento) e experimental. No grupo experimental, os corpos de prova foram submetidos a imersões diárias durante 3 minutos em um peróxido alcalino com enzima (Polident - 3 Minutos) durante sete dias consecutivos. Decorrido o tempo de imersão, os corpos de prova foram lavados em solução salina, transferidos para tubos contendo 3 mL de solução salina e colocados no ultra-som (7 W) por 30 segundos. A suspensão resultante foi utilizada para análise do biofilme. Alíquotas diluídas foram semeadas em meios de cultura específicos. As análise foram feitas nos dias 1, 4, e 7 pelo número de microorganismos e concentrações de polissacarídeos. Análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal (CLSM) foram também realizadas. O estudo demonstrou que o total de microrganismos foi menor com uso do Polident, quando comparado ao grupo controle, para todos os períodos avaliados. No entanto, o número total de *C. albicans* aumentou em todos os biofilmes expostos ao higienizador, sendo identificadas hifas nas imagens do MEV E CLSM. A concentração de polissacarídeo foi significativamente maior no grupo

experimental após 7 dias. Os autores concluíram que o uso diário de um higienizador de dentadura reduz o número de microrganismos de biofilmes de múltiplas espécies.

Yildirin-Bicer et al. (2014) avaliaram métodos alternativos de desinfecção de materiais para base protética. Foram confeccionados 320 corpos de prova de resina acrílica, sendo 160 de resina acrílica termopolimerizável (Arcon Duo) e 160 autopolimerizável (Paladent RR). Após a esterilização em autoclave, os corpos de prova foram divididos nos grupos experimentais (n=10): Grupo I – hipoclorito de sódio (10 minutos), Grupo II – micro-ondas (3 minutos), Grupo III – luz ultravioleta (20 minutos), Grupo IV – enxaguatório a base de própolis (10 minutos), Grupo V – Corega Tabs (10 minutos), Grupo VI – vinagre 50% (10 minutos) e Grupo VII - vinagre 100% (10 minutos). Os espécimes foram contaminados com suspensão de *C. albicans* (ATCC 90028) e *C. albicans* isolada da cavidade oral. Após o protocolo de higiene os corpos de prova foram enxaguados suavemente três vezes sequenciais e transferidos a tubos de ensaio contendo água destilada estéril. Em seguida foram agitado em agitado mecânico durante 1 minuto para obtenção das diluições seriadas e semadura em placas de petri contendo Agar Dextrose Sabouraud. Após a incubação a 37°C durante 24 horas, as colônias foram contadas e o número de UFC/mL calculado. Os resultados mostraram que o vinagre a 100% foi o mais efetivo frente a espécies de C. albicans obtidas da ATCC, seguido do vinagre 50%, hipoclorito a 1 %, irradiação por micro-ondas, Corega Tabs, luz ultra violeta e enxaguatório a para as resinas termopolimerizáveis. O vinagre 100% foi o mais efetivo também frente as espécies de *C. albicans* obtidas da cavidade oral para ambas as resinas. A análise da rugosidade antes e após a imersão demonstrou um maior rugosidade das resinas autopolimerizávies. Os autores concluíram que o vinagre 100% foi o mais efetivo frente as cepas de *C. albicans* e por ser econômico e de fácil acesso pode ser utilizado como método de higiene rotineiro.

Panariello et al. (2016) avaliaram a eficácia da escovação e imersão em reduzir a viabilidade de biofilme multiespécies em duas resinas acrílicas. Para tanto, foram confeccionados corpos de prova de resina acrílica (Lucitone 550 (L) e Tokuyama Rebase Fast II (T)) (n=12), com rugosidade superficial de aproximadamente 3,0 µm. Em seguida, os corpos de prova foram esterilizados por meio de óxido de etileno e inoculados com uma suspensão de 107 células/mL de *C. albicans* e *C. glabrata* e de 108 células/mL de *S. mutans e incubados a 37º C,*

*durante 90 minutos* para a aderência dos micro-organismos. Após esse período os corpos de prova foram lavados com PBS e suplementados com meio BHI estéril. Em seguida, os corpos de prova foram incubados a 37°C durante 48 horas para a maturação do biofilme. Após a formação do biofilme, os corpos de prova foram higienizados por meio de escovação ou imersão por 10 segundos nas seguintes soluções: água destilada (A); ácido peracético 0,2% - Sterilife (Ac); digluconato de clorexidina a 1% (Chx); solução água/dentifrício 1:1 (D); hipoclorito de sódio a 1% e perborato de sódio - Corega Tabs (Pb). Os micro-organismos viáveis foram avaliados por ensaio de XTT e contagem de colônias (UFC/mL). De acordo com os resultados, a escovação combinada com agentes químicos para imersão da prótese propiciou maior remoção do biofilme. A imersão em ácido acético e em hipoclorito de sódio a 1% mostrou-se tão eficaz quanto à escovação nos dois grupos de resinas avaliados. A imersão em Corega Tabs não foi eficaz na redução do número de UFC/mL de *C. albicans, C. glabrata e S. mutans* para ambas as resinas avaliadas. Entretanto a escovação com Corega Tabs foi capaz de inativar o biofilme multiespécies em ambas as resinas. Os autores concluíram que a ação mecânica exercida pelo método mecânico é fundamental para a redução do biofilme.

Coimbra et al. (2016) avaliaram , o efeito de higienizadores de próteses totais a base de peróxido alcalino frente a biofilmes microbianos formados em superfícies de resina acrílica.. Foram obtidos corpos de prova de resina acrílica (Lucitone 550; n = 360) a partir de moldes de matrizes metálicos circulares (15 × 3 mm). Os corpos de prova foram esterilizados por irradiação em micro-ondas (650 W, 6 min) e contaminados com suspensões (107 unidades formadoras de colônias (UFC) / mL) de *C. albicans* (Ca), *C. glabrata* (Cg), *S. aureus* (Sa), *S. mutans* (Sm), *B. subtilis* (Bs), *E. fecalis* (Ef), *E. coli* (Ec) e *P. aeruginosa* (Pa). Após a contaminação, os corpos de prova foram incubados a 37°C durante 48 horas e depois por meio de uma cesta de aço inoxidável, foram imersos nas seguintes soluções, de acordo com as instruções do fabricante (n = 10): Grupo CP - controle positivo (solução salina tamponada com fosfato (PBS); Grupo MI - NitrAdine®, (Medical Interporous); Grupo EF - Efferdent Plus® e Grupo CT - Corega Tabs®. Após a incubação (37°C, 24 horas), o número de colônias com morfologia característica foi contado e os valores de UFC/mL foram calculados. Houve diferenças entre os grupos, com redução significativa nos valores de UFC/mL para os micro-organismos avaliados, quando comparados com o grupo CP. Os resultados mostraram que somente o

higienizadores NitrAdine apresentou ação significativa frente a *C. albicans*. O higienizador Efferdent Plus apresentou ação significativa frente as espécies de C. glabrata, S. mutans, E. faecalis, E. coli e P. aeruginosa. O higienizador Corega Tabs foi o menos efetivo entre os higienizadores avaliados. Os autores concluíram que a solução higienizadora Medical Interporous® foi a mais eficaz em termos de ação antimicrobiana em biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S Aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa.*

Mohamed et al. (2016) verificaram a eficácia de dois higienizadores de prótese e extrato de duas plantas frente à aderência da *Candida albicans* sobre reembasadores de próteses. Sessenta amostras (10x10x2) foram preparadas de acordo com as orientações dos fabricantes. As amostras foram esterilizadas por meio de luz ultravioleta, durante 5 minutos, para cada lado. Para a contaminação as amostras foram imersas em Sabouraud broth inoculado com suspensão de células de *Candida albicans* e foram incubados durante 16 horas a 37ºC. Em seguida, as amostras foram divididas nos seguintes grupos: Grupo I – CD Clean (peróxido alcalino), Grupo II Nigella sativa (extrato experimental), Grupo III – óleo essemcial de tomilho, Grupo IV- Fittydent (peróxido alcalino) e Grupo V – água destilada, durante 8 horas em temperatura ambiente. Após os procedimentos, as amostras foram lavadas e fixadas com cristal violeta durante 1 minuto. As células fúngicas aderidas foram contadas por meio de um microscópio óptico (x400). Os resultados mostraram que o higienizador Fittydent foi mais efetivo que o higienizador CD Clean. O óleo foi mais efetivo que Nigella sativa. Na comparação entre todos os higienizadores o Fittydent® foi o mais efetivo, seguido pelo óleo essencial de tomilho, Nigella sativa e CD Clean, quando comparado ao grupo controle. Os autores ressaltaram a importância de avaliar esses higienizadores em protocolos de higiene a longo prazo.

Kiesow et al. (2016) investigaram a compatibilidade dos materiais para base protética com efeitos antimicrobianos dos higienizadores de próteses mais comumente utilizados. Foram avaliados higienizadores de prótese (Polident Overnight Whitening®), dentifrício (Colgate Total®), enxaguatório (Listerine® Original), álcool isopropílico (IPA), hipoclorito de sódio 6%, sabão para lavar louças e vinagre. A integridade dos materiais foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura e rugosímetro de superfície, após protocolos laboratoriais de higienização, simulando 2 anos de uso. Os higienizadores foram também avaliados em relação à

ação antimicrobiana contra micro-organismos comumente encontrados na cavidade oral (*C. albicans, K. Pneumoniae, S. mutans, F. Nucleatum, P. gingivalis*). Segundo os autores, o enxaguatório à base de álcool e o IPA danificaram a superfície do metacrilato de polimetila (PMMA) e a escovação com dentifrício causou arranhões e perda de material. A partir da microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que o hipoclorito de sódio causou corrosão na liga de Co-Cr. O higienizador Polident Overnight Whitening® apresentou insignificantes mudanças de aspereza a olho nu. O vinagre e sabão foram compatíveis com todos os materiais. Em relação à ação antimicrobiana, o hipoclorito de sódio promoveu excelentes resultados. Diluições concentradas foram necessárias para IPA e enxaguatórios bucais serem eficazes. O Polident foi eficaz contra todos os micro-organismos após 5 minutos de imersão. O dentífricio foi eficaz contra bactérias, mas não contra *C. albicans*. Vinagre e sabão não apresentaram ação antimicrobiana. Os autores ressaltaram que a importância da compatibilidade do material da prótese em associação a efetividade antimicrobiana dos higienizadores de prótese.

Vasconcelos (2017) avaliou a eficácia antimicrobiana de higienizadores efervescentes frente biofilme multiespécies e os possíveis efeitos na superfície de liga de cobalto cromo (Co-Cr) e resina termopolimerizável, após simulação de um período de até 5 anos de imersãos. A partir de uma matriz metálica, padrões de cera circulares (12 x 3 mm) foram obtidos e fundidos em liga de Co-Cr (DeguDent®). Após a esterilização por meio de óxido de etileno, as amostras foram imersas nos seguintes higienizadores, de acordo com as instruções dos fabricantes: Grupo I - Polident 3 minutes®, Grupo II - Steradent®, Grupo III - Polident for Partials®, Grupo IV- Efferdent®, Grupo V- Corega Tabs®, Grupo VI - Nitradine®, Grupo VII - Fixodent® e Grupo VIII - Kukident® . Primeiramente, foi avaliada a resistência à corrosão (Ecorr, Ipass) (n=5) por meio do Potenciostato/Galvanostato. Em seguida, foram realizadas análises qualitativas complementares com Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS). Para a avaliação da rugosidade de superfície do metal e da resina, cada disco metálico foi incluído em mufla preparada por matrizes circulares de cera (20 x 5 mm), incorporando-o à resina acrílica termopolimerizável (Clássico Ltda®). Os grupos das 4 pastilhas que apresentaram a menor taxa de corrosão e da água destilada (controle) (n=9) foram analisados quanto à rugosidade da superfície metálica e da resina acrílica (Sa, µm) por meio de microscopia confocal a laser. A avaliação da

alteração de cor (ΔE) da resina foi realizada por meio de espectrocolorímetro no início e após a simulação de ½, 1, 2, 3, 4 e 5 anos e alteração de massa (g), no início e final, em balança de alta precisão. Para avaliação da eficácia antimicrobiana os espécimes mistos foram contaminados com biofilme misto composto por: *S. mutans* (*Sm*), *S. aureus* (*Sa*), *C. albicans* (*Ca*) e *C. glabrata* (*Cg*) e, posteriormente, imersos nas soluções higienizadoras, de acordo com as instruções dos fabricantes. Os resultados mostraram que Poliddent 3 minutes causou a menor taxa de corrosão e NitrAdine, o menor potencial de corrosão. Com o MEV, verificou-se evidenciação da microestrutura da liga metálica. Quanto à rugosidade superficial do metal, Corega Tabs ($p=0,009$) e NitrAdine ($p=0,036$) causaram aumento na rugosidade em relação ao tempo (Friedman). Na resina, houve aumento da rugosidade após 5 anos ($p<0,01$). Não houve diferença na cor da resina acrílica, tanto em relação às soluções quanto aos tempos. Quanto à ação antimicrobiana o higienizador NitrAdine propiciou redução de UFC de *Sm*. O autor conclui que embora todas as pastilhas efervescentes não tenham alterado a superfície do metal e da resina acrílica de maneira significativa, nenhuma pastilha efervescente avaliada apresentou ação antimicrobiana significativa frente ao biofilme misto; sendo que somente o NitrAdine apresentou alguma ação antimicrobiana frente ao biofilme, reduzindo a quantidade de *S. mutans*.