UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

INGRID MACHADO DE ANDRADE

Avaliação da ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre estreptococos do grupo mutans, presentes em próteses totais.

Ribeirão Preto
2007

INGRID MACHADO DE ANDRADE

Avaliação da ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre estreptococos do grupo mutans, presentes em próteses totais.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre, junto ao Departamento de Materiais Dentários e Prótese.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin

Ribeirão Preto
2007

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Ingrid Machado de

Avaliação da ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e estreptococos do grupo mutans, presentes em próteses totais. Ribeirão Preto, 2007.

142 p. : il. ; 30cm

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

Orientadora: Souza-Gugelmin, Maria Cristina Monteiro de

1. *Candida albicans*. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Prótese total. 4. pastilhas efervescentes. 5. Ultra-som.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ingrid Machado de Andrade

Avaliação da ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre estreptococos do grupo mutans, presentes em próteses totais.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Data da defesa: ____/____/ 2007

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, pela minha vida, por sua presença constante e por me dar segurança para seguir em busca dos meus sonhos.

*Aos meus queridos e amados pais, **Josefino e Ademilde**, por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida, bem como pelo apoio, amor, dedicação, incentivo e amizade que me animam a lutar pelos meus sonhos, com coragem e determinação, dando - me forças para viver e seguir em frente.*

*Aos meus queridos irmãos **Kelly, Stella e Clint**, que sempre estiveram comigo, apoiando e alegrando minha caminhada.*

*Ao meu namorado **Clelson**, pelo companheirismo, carinho e amizade em todas as horas.*

A todos os meus familiares que, de uma forma ou de outra, torceram por mim e pela realização deste trabalho.

Dedico este trabalho

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

*À Profa. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza-
Gugelmin, por toda dedicação, apoio e cooperação, agradeço
o incentivo e a confiança depositada em meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos, por todo suporte a mim oferecido, bem como pela atenção e orientações recebidas no programa PAE.

À Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva, por todo apoio, atenção e incentivo a mim dedicados e por todas as sugestões e ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza pela análise estatística.

À Profa. Regina Célia Candido pela identificação das leveduras.

Ao Prof. Dr. Vinicius Pedrazzi, por sua atenção, incentivo e pelo apoio e análise de meus relatórios.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, representada pela Diretora Profa. Dra. Marisa Semprini, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Ao Coordenador da Pós-Graduação na área de Reabilitação Oral, Prof. Dr. Luiz Osvaldo Bezzon, por toda atenção e suporte a mim oferecidos.

Aos professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por toda contribuição para minha formação como Mestre.

Aos colegas de pós-graduação, pelo excelente convívio.

Um agradecimento especial à pós-graduanda Patrícia Costa Cruz, por sua amizade e companheirismo; e ao pós-graduando Marco Vasco que, sem medir esforços, foi sempre prestativo.

Às técnicas do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP - USP, Maraísa Palhão Verri e Stella Felipe de Freitas pelo auxílio no preparo do material.

À técnica da Disciplina de Micologia da FCRP - USP, Ludmilla Tonani pelo valioso auxílio na identificação das leveduras.

Às funcionárias da FORP – USP Regiane de Cássia Tirado, Ana Paula Xavier, Regiane Moi e Isabel Sola, por toda a atenção e informações recebidas .

A todos os pacientes que participaram deste trabalho, com disponibilidade, dedicação e carinho.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Muito obrigado.

RESUMO

ANDRADE, I.M. **Avaliação da ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre estreptococos do grupo mutans, presentes em próteses totais.** 2007. 142f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Com o aumento da expectativa de vida temos um maior contingente de pessoas portadoras de próteses totais, contudo não temos um protocolo bem estabelecido para higienização/desinfecção dessas próteses pelo paciente após a sua instalação. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a ação antimicrobiana de diferentes meios de higienização de próteses totais, afim de se estabelecer um protocolo eficaz para a manutenção das próteses e com isso prevenir futuras estomatites protéticas. Para tanto foi testada a ação antimicrobiana dos agentes químico - a pastilha efervescente; e físico - o ultra-som, contra leveduras do gênero *Candida*, freqüentemente associadas à estomatite protética e contra os estreptococos do grupo mutans, responsáveis pela consolidação e progressão de alguns tipos de biofilme. 113 indivíduos participaram desta pesquisa, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, a saber: A- controle (25 pacientes) - apenas escovaram suas próteses com água, 3 vezes ao dia; B- (29 pacientes) utilizaram 1 pastilha efervescente ao dia por 5 minutos, durante 21 dias; C- (28 pacientes) fizeram o mesmo procedimento que o grupo A, com exceção de que, após 21 dias, as próteses foram submetidas ao ultra-som por 15 minutos; D-(31 pacientes) fizeram o mesmo que o grupo B, com exceção de que, após 21 dias, as próteses foram submetidas ao ultra-som por 15 minutos. Todos os procedimentos foram realizados por 21 dias e todos os grupos realizaram escovação da prótese com escovas dentais de cerdas macias Bitufo® e água. As colheitas do material das próteses ocorreram durante o exame inicial e após 21 dias da realização dos procedimentos de higienização listados acima. Antes do início dos procedimentos de higienização, todas as próteses receberam profilaxia profissional, afim de remover completamente o biofilme existente. As colheitas foram feitas por meio de escovação das próteses com PBS (salina tamponada fosfatada). Estas amostras foram submetidas a diluição decimal seriada e semeadas em placas contendo BHIA (Brain Heart Infusion Agar), Chromagar-Candida e SB20 (Ágar Sacarose Bacitracina) para a quantificação de aeróbios totais, *Candida sp* e estreptococos do grupo mutans, respectivamente. Após incubação em aerobiose por 24 horas; em aerobiose por 48 horas e em microaerofilia por 48-72 horas respectivamente, era realizada a quantificação dos microrganismos pesquisados e a verificação da eficácia dos procedimentos testados. Os resultados entre os tratamentos foram comparados por espécie, por meio de ANOVA para um fator de variação; ou por meio do teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$), a depender da aderência à distribuição normal. Pôde-se verificar que, frente à *C. albicans* (ANOVA, $P=0,761$), *C. tropicalis* (Kruskal-Wallis, $P=0,944$) e *C. glabrata* (Kruskal-Wallis, $P=0,803$), os 3 tratamentos testados (pastilha efervescente, ultra-som e associação pastilha efervescente e ultra-som) não diferiram significativamente do controle (escovação e água), quanto à ação antimicrobiana. Por outro lado, o tratamento com pastilha efervescente e a associação pastilha efervescente e ultra-som, mostraram-se altamente eficientes em relação às cepas de estreptococos do grupo mutans (ANOVA, $P<0,001$). Em relação aos aeróbios totais, o tratamento com pastilhas efervescentes mostrou uma significativa ação antimicrobiana, enquanto que a associação pastilha efervescente e ultra-som apresentou uma moderada ação sobre estes microrganismos (ANOVA, $P=0,011$).

Palavras-chaves: Biofilme, produtos de higiene oral, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, peróxido alcalino, ultra-som, pastilhas efervescentes e prótese total.

ABSTRACT

ANDRADE, I.M. **Avaliação de efervescentes e ultrassom antimicrobiano contra *Candida sp* e *Streptococcus mutans* em próteses totais.** 2007. 142f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

With the increase of life expectation there is a greater number of people denture wearers. However, there isn't any protocol properly established about good oral hygiene/ disinfection these dentures by patient after its installation. The aim of this survey was evaluate the antimicrobial action of different hygiene methods to full maxillary dentures in order to establish some efficient protocol to maintenance of dentures and with this to prevent from future denture stomatitis. In this way, the antimicrobial action of a physical-chemical agent, effervescent tablets and of a physical agent, the ultrasonic were tested against *Candida sp* yeast which are frequently associated with denture stomatitis and against *Streptococcus mutans* which are responsible for consolidation and progression of some types of biofilm. 113 individuals who took part in this study were randomly assigned to one of 4 groups: A - Control (25 individuals): They just brushed their dentures with water, three times per day; B - (29 individuals): used of one effervescent tablet per day during five minutes; C - (28 individuals): the same of the group A, with exception of that after 21 days they had had their dentures submitted to ultrasonic for 15 minutes; D - (31 individuals): the same of the group B, with exception of that after 21 days they had had their dentures submitted to ultrasonic for 15 minutes. All procedures were carried out for 21 days and all groups brushed the dentures with dental brushes of soft bristles and water. The samples of dentures material were collected at baseline before any treatment after 21 days of treatment listed above. Prior to the beginning of these hygiene procedures, all dentures received professional prophylactic brushing in order to remove entirely the biofilm existent. The samples were collected by brushing the dentures with PBS, and sent to serial decimal dilution and plated in BHIA (Brain Heart Infusion Agar), in Chromagar-Candida and in SB20 (Agar Sacarose Bacitracina) to quantification total aerobics, *Candida sp* and *Streptococcus mutans*, respectively. After incubation in aerobiosis for 24 hours, in aerobiosis for 48 hours and in microaerophilic for 48-72 hours, respectively. The outcomes among the treatments were compared by species, using ANOVA test to one factor of variation; or using Kruskal-Wallis test ($\alpha=0,05$), depending on adherence to normal distribution. It was verified that the antimicrobial action of the three treatments tested (effervescent tablets, the ultrasonic and the association between effervescent tablets and ultrasonic) weren't statistically different of the Control (brushing and water), against *C. albicans* (ANOVA, $P=0,761$), *C. tropicalis* (Kruskal-Wallis, $P=0,944$) e *C. glabrata* (Kruskal-Wallis, $P=0,803$). However, the effervescent tablets treatment and the association between effervescent tablets and ultrasonic were highly efficient in relation to *Streptococcus mutans* (ANOVA, $P<0,001$). As for to total aerobics, the treatment with effervescent tablets showed a significant antimicrobial action, whereas the association between effervescent tablets and ultrasonic showed a moderate action against these microorganisms (ANOVA, $P=0,011$).

Key-words: Biofilm, oral denture cleansers, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, effervescent tablets, ultrasonic.

SUMÁRIO

Sumário

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISTA DA LITERATURA	6
2.1 Biofilme e microbiota	7
2.2 Leveduras do gênero <i>Candida</i>	15
2.3 Estreptococos do grupo mutans	38
2.4 Agentes Físicos e químicos de Higienização de próteses	46
2.4.1 Agentes Físicos	46
2.4.1.1 Escovação	46
2.4.1.2 Ultra-som	50
2.4.2 Agentes Químicos	53
2.4.2.1 Hipoclorito alcalino.....	54
2.4.2.2 Ácidos	54
2.4.2.3 Desinfetante.....	54
2.4.2.4 Enzimas	55
2.4.2.5 Pastilhas efervescentes à base de peróxido alcalino	55
3. PROPOSIÇÃO	62
3.1 Objetivo Geral	63
3.2 Objetivos Específicos	63
4. MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1 Seleção de pacientes	65
4.2 Evidenciação do biofilme	69
4.3 Colheita e Semeadura das amostras	70
4.4 Contagem/Identificação das colônias dos estreptococos do grupo mutans.....	74
4.5 Contagem/Identificação do número de leveduras do gênero <i>Candida</i>	76
4.6 Cálculo do número de unidades formadoras de colônias de estreptococos do grupo mutans e de leveduras do gênero <i>Candida</i>	77
4.7 Meios de cultura e eluentes.....	78
4.8 Identificação de leveduras	81
4.8.1 Crescimento à 45°C.....	81
4.8.2 Estudo da micromorfologia (microcultivo em lâmina)	81
4.8.3 Prova da Uréase.....	82
4.8.4 Fermentação de carboidratos (Zimograma)	82
4.8.5 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Auxanograma)	83

4.8.6 Produção de ascósporos.....	84
4.8.7 Teste do TTC.....	84
4.8.8 Meios de cultura para identificação de leveduras.....	85
4.9 Forma de análise dos resultados.....	90
4.9.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes tratamentos empregados para a higienização das próteses totais superiores.....	90
4.9.2 Análise Estatística	90
5. RESULTADOS	91
5.1 Análise Estatística	104
6. DISCUSSÃO.....	108
7. CONCLUSÕES.....	118
REFERÊNCIAS	120
APÊNDICES	132
ANEXOS.....	141

1. INTRODUÇÃO

Há estimativas de que em 2025 o Brasil terá uma população de 31,8 milhões de idosos. E assim, será o 6º país do mundo em população idosa. Há portanto a necessidade de um investimento na reabilitação e manutenção do funcionamento de seu aparelho estomatognático, de modo a garantir ao idoso, adequada pronúncia, mastigação e deglutição, bem como atender a seus aspectos psicológicos e estéticos. Assim, as próteses dentárias aliadas a um protocolo eficiente para a higienização e manutenção destas, será de suma importância (CARVALHO et al., 2003).

Muitas pesquisas revelam que a maioria da população usuária de próteses totais tem falhado na manutenção da limpeza de suas próteses (ANDRUCIOLLI et al., 2004, BUDTZ-JORGENSEN et al., 1975; HOAD-REDDICK et al., 1990; KULAK-OZKAN et al., 2002; PARANHOS et al., 2000).

A prótese total quando não bem higienizada torna-se importante fonte de infecção para o paciente. Além disso, portadores de próteses totais geralmente são idosos, e sendo assim, muitos apresentam comprometimentos sistêmicos, que os tornam mais suscetíveis às infecções; e, às vezes, também possuem dificuldades motoras, que comprometem a higienização da prótese.

Aliado a esses fatores, Garcia Júnior (2002) aponta o fato de que as resinas acrílicas quando colocadas na cavidade oral adsorvem e absorvem fluidos orais e tornam-se contaminadas com diferentes microrganismos. Desta forma, o usuário de prótese tem uma alta incidência de estreptococos do grupo mutans, leveduras, estafilococos e lactobacilos em sua cavidade oral (MARSH et al., 1992).

Assim, microrganismos da cavidade oral iniciam a formação do biofilme protético aderindo-se sobre as superfícies da prótese. Alguns microrganismos apresentam a capacidade de penetrar nas porções internas da resina acrílica, e

outros acabam ficando retidos nas concavidades ou nas porosidades da resina acrílica (MOLINARI et al., 1990). A interface formada entre a resina acrílica e a mucosa oral se torna um ambiente ideal para a formação do biofilme, devido às irregularidades da resina e à temperatura da boca, que é de aproximadamente 37°C (KENG; LIM, 1996). Neste nicho freqüentemente se manifesta a estomatite protética (BUDTZ-JORGENSEN et al., 1975; KREHER et al., 1991).

Vários trabalhos científicos relatam um estreito relacionamento entre a presença de leveduras do gênero *Candida*, especialmente de *Candida albicans* e a estomatite protética (BUDTZ-JORGENSEN, 1976; BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; KULAK-OZKAN et al., 2002).

Onze por cento a sessenta e sete por cento dos portadores de prótese são acometidos pela estomatite protética. Critérios de diagnóstico diferentes ou diferenças nos grupos podem explicar a variação (ARENDORF; WALKER, 1987; BARTHOLOMEW et al., 1987; BUDTZ-JORGENSEN; LOE, 1972; KULAK-OZKAN et al., 2002). Embora a etiologia da estomatite protética seja considerada multifatorial, e envolva fatores como a redução do fluxo salivar, rugosidade e microporosidades da resina acrílica, traumas, alterações de pH no biofilme protético, diabetes e comprometimento imunológico (WEBB et al., 1998a), a deficiência de higiene oral e da prótese é tida como um dos principais fatores, que predispõem à manifestação da estomatite protética (PIRES et al., 2002), uma vez que facilita, tanto o desenvolvimento de *Candida* como de bactérias na saliva e, conseqüentemente, a colonização do biofilme nas mucosas orais e na prótese (NIKAWA et al., 1998; PIRES et al., 2002; WEBB et al., 1998b).

Barbeau et al. (2003) demonstraram que a adesão de leveduras às superfícies protéticas é um pré-requisito para a colonização do palato, indicando que

o acrílico serve de reservatório para estes microrganismos. Assim, a maior incidência de leveduras na cavidade oral de pessoas idosas está relacionada ao uso de próteses totais (BUDTZ- JORGENSEN et al., 1975; KREHER et al., 1991) e à presença de estomatite protética (KREHER et al., 1991).

Leveduras do gênero *Candida* são encontradas na cavidade oral de 25% a 50% dos indivíduos sadios, no entanto considerando-se apenas os portadores de próteses, estes valores aumentam para 60% a 100%. A *Candida albicans* é a espécie mais freqüentemente detectada, representando aproximadamente 70% das cepas isoladas. Outras espécies de *Candida*, também presentes na cavidade oral de portadores ou não de próteses, incluem: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* entre outras (JORGE et al., 1991; PIRES et al., 2002).

Além disso, *C. albicans* pode estar associada a outros tipos de *Candida* ou bactérias como *S. mutans*. Este, assim como outras bactérias, favorece a adesão de *Candida* à superfície da mucosa, bem como da prótese (JEKINSON; HARISH , 1990; MONROY et al., 2005; NIKAWA; ERGUSA, 2001); pois produz ácido, tornando o ambiente ideal para o crescimento de *Candida* e de outros microrganismos (BARNABÉ et al., 2004; WALTIMO et al., 2004). Convém ressaltar que o *S. mutans* produz a partir do metabolismo do açúcar, polissacarídeos com propriedades adesivas que favorecem sua adesão às estruturas orais (ROCHA et al., 2003).

Considerando as dificuldades de higienização da prótese total, em razão de suas características anatômicas, bem como das microporosidades inerentes às resinas acrílicas, e da redução das habilidades manuais do paciente em decorrência da idade, torna-se prioritário e essencial, que o dentista oriente, ou melhor, conscientize seus pacientes da necessidade de se higienizar a mucosa e a prótese

adequadamente, para a preservação da saúde oral e sistêmica dos mesmos, e para a manutenção de suas próteses.

Segundo Tamamoto et al. (1985), produtos de limpeza que visem a remoção de *Candida* são necessários e importantes para prevenir estomatites causadas por trauma de próteses totais.

Atualmente, existem meios físicos e químicos disponíveis para facilitar a higienização das próteses. Assim, a presente pesquisa objetivou avaliar a ação antimicrobiana de um agente físico e de um agente químico, frente aos estreptococos do grupo mutans, visto que estas bactérias são responsáveis pela consolidação e progressão do biofilme dental e protético, e frente às leveduras do gênero *Candida*, uma vez que têm sido constantemente relacionadas ao uso de prótese total e à falta de higienização destas. Para isto, foi selecionada a cuba de ultra-som como agente físico, visto que este aparelho tem se destacado dentre os métodos mecânicos, por não gerar rugosidade nas superfícies da prótese; e como agente químico, foi selecionada a pastilha efervescente à base de peróxido alcalino, uma vez que a mesma tem se destacado dentre os métodos de imersão, por ser segura e praticamente não afetar a superfície das resinas acrílicas.

2. REVISTA DA LITERATURA

2.1 Biofilme e microbiota

Assim como nos indivíduos dentados, existe também nos usuários de próteses totais uma grande variabilidade no grau de deposição de biofilme entre os indivíduos e em diferentes partes da cavidade bucal (KENG; LIM, 1996; LANGWELL, 1955).

A formação do biofilme sobre a superfície acrílica ocorre de maneira similar à que ocorre na superfície dental. Inicialmente existe uma absorção de glicoproteínas salivares pela resina formando a película adquirida, com subsequente colonização bacteriana à superfície da mesma (FRANK; STEUER, 1985; LAMFON et al., 2004; QUIRYNEN et al., 1988; SHAY, 2000; STREENIVASAN et al., 2004).

O “biofilme dentadura” é definido como uma densa camada microbiana contendo microrganismos e seus metabólitos (ANDRUCIOLI et al., 2004).

Neill (1968) descreveu a formação do biofilme dentadura em três fases:

- primeira fase: a mucina e os restos alimentares acumulam-se na superfície da resina acrílica, sendo que estes depósitos oferecem pouca resistência aos procedimentos de limpeza.
- segunda fase: estes depósitos resultam no acúmulo de biofilme, que se desenvolve e matura. Os contaminantes superficiais mucilaginosos ganham adesão ao material de base da prótese e formam um depósito semelhante à “película da dentadura”, que atua como matriz para deposição de manchas derivadas da composição de substâncias alimentares e do tabaco. Essa matriz pode ser invadida por sais de cálcio presentes na saliva.
- terceira fase: a calcificação progride até a matriz orgânica tornar-se completamente solidificada, dando origem ao cálculo localizado, geralmente adjacente às aberturas

dos ductos salivares (flancos bucais das próteses superiores e flancos sublinguais das próteses inferiores).

Edgerton e Levine (1992) descreveram a constituição bioquímica da película adquirida na formação do biofilme da dentadura. A película formada após duas horas de inserção da prótese criteriosamente higienizada (escovação e ultrassom), na cavidade bucal foi colhida e analisada. Verificaram a presença de amilase salivar, mucina de alto peso molecular, lisozima, albumina, uma maior quantidade de imunoglobulina A, com produtos de degradação e componentes celulares de *Candida albicans*, indicando uma maior atividade deste microrganismo.

Gocke; Gerath e von Schwanewede (2002) identificaram os substratos da película salivar adquirida formada sobre a resina acrílica na cavidade bucal, como a α -amilase, as proteases, proteases inibitórias, imunoglobulina A, imunoglobulina G, peroxidases, tiocianeto, lisozima e cálcio. Todos os componentes foram encontrados com larga variação de coeficientes.

Segundo Baehni e Takeuchi (2003), o biofilme se caracteriza como uma íntima associação de microrganismos envoltos por uma matriz exo-polimérica de metabólitos (polissacarídeos), onde se agregam também componentes salivares.

Para que o biofilme seja formado, é necessária a interação de microrganismos de diferentes espécies. Após a colonização inicial, as bactérias se multiplicam originando micro-colônias que propiciam ambiente ecológico favorável ao desenvolvimento e agregação das mesmas (MARSH et al., 1994).

Alguns microrganismos apresentam a capacidade de produzir cápsulas a partir da sacarose e da glicose provenientes da dieta que, além da consolidação do biofilme, tem a função de proteger e de servir de reserva nutritiva aos microrganismos (LAMFON et al., 2004; SHAY et al., 2000).

Geralmente nos indivíduos usuários de próteses totais, o biofilme se torna colonizado pela *Candida albicans*, sendo esta detectável em maior densidade nos pacientes com candidíase atrófica crônica (BARBEAU et al., 2003; PIRES et al., 2002; WATKINSON; McCREIGHT; WORNOCK, 1985).

Carlsson, Soderholm e Almfeldt (1969) colheram amostras de biofilme de próteses totais e de saliva de vinte desdentados para avaliar a prevalência de *S. sanguis*, *S. mutans* e *S. salivarius*. O *S. salivarius* não foi encontrado em nenhuma das próteses, o *S. sanguis* foi detectado em dezessete dos pacientes, e o *S. mutans* em catorze. Estes microrganismos tiveram maior predominância nas amostras de biofilme da superfície da prótese do que nas amostras salivares. Dos vinte pacientes, sete concordaram em não utilizar suas próteses por dois dias e tiveram suas próteses reembasadas para melhorar a adaptação. Novamente foi realizada a colheita salivar, e o número de *S. sanguis* e *S. mutans* mostrou-se substancialmente reduzido. Quando os pacientes retornaram ao uso de suas próteses por um período de dois a quatro dias, ambos microrganismos foram detectados em todos os sete pacientes. Os resultados mostraram que a presença destes microrganismos está influenciada pelo uso de próteses, ao contrário do que acontece com o *S. salivarius*.

Davenport (1970), investigando a distribuição e concentração de *C. albicans* na cavidade oral de pacientes com e sem estomatite, constatou a presença de leveduras em 98% dos pacientes com estomatite e em 60% nos pacientes do grupo controle. A concentração de *Candida* foi maior nos esfregaços provenientes das superfícies internas das próteses do que nos esfregaços provenientes da mucosa (em ambos os grupos). Os resultados das culturas de salivas mostraram a presença de *C. albicans* em 70% dos pacientes com estomatite e em 20% dos pacientes do grupo controle. Nas biópsias, não foi evidenciada *Candida*. Segundo o

autor a *Candida* está localizada principalmente no interior do biofilme e não na mucosa palatina. Isto sugere que o tratamento deve ser direcionado principalmente para a prótese total. Este achado é relevante, no que diz respeito à patogenia, diagnóstico e tratamento da estomatite.

Olsen (1974), também investigando a frequência e distribuição de vários fungos envolvidos na estomatite, notou maiores quantidades na prótese total que no palato. Foram encontradas oito diferentes espécies de leveduras, sendo as mais frequentes *C. albicans* e *C. glabrata*. Os achados sustentam o ponto de vista de muitos pesquisadores de que a *Candida* é um importante fator etiológico na estomatite de dentadura, pois ela foi identificada na maioria dos casos. O autor considera que esta desordem deva ter o tratamento direcionado contra as leveduras localizadas na dentadura e na mucosa oral.

Theilade; Budtz-Jorgensen e Theilade (1983), analisando microbiologicamente a mucosa palatina sadia de oito pacientes usuários de próteses totais, verificaram uma frequência de estreptococos entre 0% a 81% (média de 41%) dos microrganismos isolados com proporções variando de *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguis*. As leveduras correspondem de 0% a 0,45% (média de 0,002%) do total viável. Este estudo mostrou que a microbiota do biofilme da dentadura é em grande parte similar a algumas formas do biofilme dental, sendo significativa a presença do estreptococos.

Vandenbussche e Swinne (1984) também notaram um grande número de leveduras na cavidade bucal de usuários de próteses totais, especialmente *C. albicans* e *C. glabrata*. A *C. albicans* foi isolada em 82% e a *C. glabrata* em 48% dos

pacientes com mucosa oral saudável. As duas espécies estavam associadas em 41% dos casos.

Koopmans, Kippuw e Graaff (1988) analisando a microbiota da mucosa palatina, bem como a da superfície interna da prótese total, notaram que estas consistem principalmente de bactérias gram-positivas. Foram encontradas diferenças nas proporções de cocos entre a microbiota predominante nas próteses totais, pois no grupo controle estudado (mucosa normal), 69% da microbiota consistiu de cocos, enquanto que no grupo com estomatite, foi encontrada uma média de 33%. A microbiota do biofilme das próteses e dos palatos do grupo controle mostraram uma média de bactérias anaeróbias de 35% e 31% respectivamente, enquanto que no grupo da estomatite, essas percentagens foram 56% e 43%. A *Candida* foi detectada em ambos os grupos e em ambos os locais (palato e superfície interna das próteses) em número muito baixo. Os microrganismos predominantes foram os estreptococos.

Os estreptococos têm grande importância no início da formação do biofilme sobre as superfícies dentárias. A presença dos dentes estabelece regiões para o desenvolvimento de microrganismos adaptados às condições do meio gerado por essas estruturas. As características físico-químicas do esmalte e da película adquirida, associadas à ocorrência de substratos comuns na dieta humana, como sacarose, permitem a adesão e fixação de alguns tipos de microrganismos capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares - substâncias com propriedades coesivas. Bactérias como o *Streptococcus mutans* possuem essa capacidade e parecem colonizar preferencialmente superfícies lisas (CATALONOTO, SHKLAIR; KEENE, 1975; GIBBONS; Van HOUTE, 1973). Essas bactérias, além de iniciarem a colonização, parecem apresentar um potencial inflamatório próprio. De forma

semelhante, pode também ocorrer a colonização de aparelhos protéticos, sendo que seus antígenos têm sido relacionados também com estomatite induzidas por próteses em diversos estudos (BUDTZ-JORGENSEN; THEILADE; THEILADE, 1983; JORGE et al., 1990; KOOPMAN; KIPPUW; GRAAFF, 1988; RADFORD; RADFORD, 1993; THEILADE; BUDTZ-JORGENSEN, 1980, 1988; WALTER; FRANK; STEUER, 1986).

Theilade e Budtz-Jorgensen (1988), estudando a microbiota de oito pacientes com estomatite, encontraram que os estreptococos constituíram de 17% a 76% dos microrganismos isolados em cada amostra (média 29%) e foram identificados como *S. mitior*, *S. milleri*, *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguis*. Os estafilococos (principalmente *S. aureus*) constituíram de 2% a 15% (média 6%). Os bacilos gram-positivos constituíram de 5% a 72% (média 45%). Cocos gram-negativos constituíram de 0% a 28% (média 15%) e bacilos gram-negativos somente de 0% a 1,8%. A contagem de leveduras viáveis correspondeu de 0% a 1,7%. Os resultados mostraram que o biofilme de próteses indutor de estomatite tem uma microbiota bacteriana complexa e variável, principalmente gram-positiva, sendo similar à microbiota bacteriana de pacientes com mucosa oral sadia. A microbiota bacteriana nos casos de estomatite apresentou, porém, uma percentagem maior de leveduras. Segundo os autores, dada a similaridade e a grande variação individual entre os pacientes, a quantificação do biofilme da prótese total deve ser mais importante do que a sua composição e que, apesar de as leveduras serem consideradas microrganismos patogênicos oportunistas, importantes na estomatite protética, as bactérias também possuem um papel relevante. Estes microrganismos parecem contribuir para a patogenicidade, que é aumentada por condições de

higiene precária e pelo freqüente consumo de açúcar, favorecendo então o desenvolvimento de bactérias e leveduras acidogênicas e acidúricas.

Segundo alguns autores, na maioria dos casos, o biofilme bacteriano é produzido por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (CHANDRA et al., 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002; DOUGLAS, 2002; MONROY et al., 2005; RAMAGE et al., 2001). Para outros, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* são as espécies de leveduras mais freqüentemente encontradas no biofilme (MONROY et al., 2005).

O longo tempo de sobrevivência dos microrganismos é dependente de sua habilidade para ligar-se às superfícies e formar biofilme aderente. O contato com uma superfície sólida é o gatilho para a expressão de enzimas bacterianas, as quais catalisam a formação de polissacarídeos viscosos que promovem colonização e proteção. As bactérias, algumas vezes, expressam fenótipos mais virulentos, quando crescem no biofilme. Os microrganismos tendem a ser mais resistentes a agentes antimicrobianos e isto dificulta uma resposta apropriada do sistema imune (LAMFON et al., 2004).

A aderência de microrganismos e debris é também favorecida pela topografia áspera e irregular da superfície de resina metacrilato (GLASS et al., 2004; PESCI-BARDON et al., 2004; SHAY, 2000). Tais irregularidades fornecem um aumento na área de superfície e na expansão do número de nichos não limpos pela ação da língua ou musculatura orofacial. Apesar da aparência lisa da superfície, essas resinas mostram uma superfície irregular, quando observadas ao microscópio. Isto decorre da formação de bolhas de monômeros não polimerizados durante o processamento da dentadura (GLASS, 2004; ROCHA et al., 2003; SHAY, 2000).

Contudo, a aspereza de superfície não é o fator mais importante no processo de formação do biofilme, pois o processo de colonização ou formação de biofilme inclui a aderência, crescimento e co-adesão. A aderência e a co-adesão são reguladas por fatores não específicos tais como: interações hidrofóbicas e eletrostáticas, e interações específicas como interações adesina-receptor ou integrina receptor (NIKAWA et al., 2003).

A acidogenicidade do biofilme resultante da presença de carboidratos, (NIKAWA et al., 1994) ou metabólitos dos microrganismos presentes no biofilme, tem um papel importante no aparecimento de lesões na mucosa bucal. A acidez cria um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos entre a prótese e a mucosa (SHAY, 2000). Segundo Nikawa, Hamada e Yamamoto (1998), os ácidos como o acetato, piruvato e propionato produzidos pela *Candida albicans*, ativam as proteases, fosfolipases e collagenases, que danificam a estrutura do tecido e permitem a invasão e a aderência deste microrganismo.

As proteínas salivares, principalmente as mucinas, que recobrem a mucosa oral e as superfícies internas das próteses dentárias, podem atuar como receptores específicos para *C. albicans* e outros microrganismos (MONROY et al., 2005; NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998).

Além disso, o uso de medicamentos ou a presença de patologias também favorece a proliferação microbiana, posto que a redução do fluxo salivar tem como consequência a diminuição da ação antimicrobiana (LAMFON et al., 2004; SHAY et al., 2000).

2.2 Leveduras do gênero *Candida*

As leveduras mais comumente associadas ao biofilme de próteses são do gênero *Candida* (HARRISON; JOHNSON; DOUGLAS, 2004; NIKAWA, et al., 2001; RAMAGE et al., 2004; SHAY, 2000).

Espécies de *Candida* são encontradas na cavidade oral de 25% a 50% dos indivíduos saudáveis, incluindo adultos e crianças. Agora, quando se consideram apenas os usuários de próteses totais, os valores aumentam para 60% a 100% (PIRES, et al., 2002).

Candida albicans é uma levedura oportunista que causa infecções tópicas e sistêmicas em humanos (NIKAWA et al., 2004), possui uma parede celular espessa, que por ser constituída de uma material fibroso, fornece proteção a estes microrganismos (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991). Vários fatores tais como aderência, persistência, dimorfismo e/ou formação de tubo germinativo, interferência com o sistema de defesa do hospedeiro, sinergismo com bactérias e produção de hidrolases ou outros metabólitos são considerados fatores de virulência destes fungos. A aderência é um dos fatores mais importantes, pois a colonização das superfícies orais pode servir como reservatório para a disseminação de infecções (NIKAWA et al., 2001). *Candida albicans* são particularmente efetivas em colonizar as crateras formadas pela intersecção de uma bolha de monômero com uma superfície polida de resina acrílica, da qual elas são dificilmente erradicadas (SHAY, 2000). As próteses acrílicas portanto desempenham um importante papel no aumento do risco à colonização por *Candida*, por atuar como reservatório de microrganismos (HE et al., 2006). Alguns estudos revelam que o maior número de leveduras é encontrado na superfície palatina da prótese e não no palato, o que indica que o acrílico atua como um reservatório, e que a adesão à superfície da

prótese seria um pré-requisito para a colonização do palato. Além disso, estudos também revelam que a higienização deficiente e a falta de adaptação da prótese são fatores que favorecem o crescimento de *Candida* (KULAK et al., 2002).

A adesão de *Candida* à mucosa é favorecida por diferentes fatores relacionados às leveduras, tais como a transição de blastoconídeo para hifa, a produção de várias enzimas extracelulares como proteinases e fosfolipases, bem como pelas condições do ambiente bucal tais como temperatura, pH, concentração de carboidratos, etc (MONROY et al., 2005).

Outras espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* são também usualmente isoladas de usuários e de não usuários de próteses (BERDICEVSKY et al., 1980; JORGE et al., 1991; PIRES et al., 2002).

Lanfon et al. (2003) investigaram a capacidade de *C. albicans* para formar biofilme no esmalte, na dentina, em resina acrílica de próteses totais com a mesma rugosidade de superfície e em resina acrílica de próteses totais com diferentes rugosidades de superfície, sob condições que podem existir *in vivo*. Discos de esmalte, de dentina e de resina acrílica foram confeccionados e tiveram suas superfícies preparadas, de modo que a mesma rugosidade fosse obtida. Em um experimento paralelo, discos de resina acrílica tiveram suas superfícies preparadas, de modo que rugosidades diferentes fossem obtidas. Biofilme de *Candida albicans* foi produzido sobre os discos com auxílio de um aparelho, que produz continuamente finas camadas de líquido sobre os microrganismos aderidos. O biofilme produzido foi mantido em saliva artificial. Em alguns períodos de tempo, os materiais eram removidos do citado aparelho, para que o biofilme fosse interrompido e o número de leveduras e hifas presentes fossem determinados. Os resultados mostraram que o número total de células de leveduras no esmalte foi maior do que

na dentina e do que nos discos de resina acrílica. O mais elevado número de células de leveduras foi encontrado nas superfícies mais rugosas no período de 6 horas; contudo, o mais elevado número de hifas foi encontrado no esmalte nos períodos de 6 e 24 horas. Imagens observadas ao microscópio revelaram que a maturação do biofilme nos discos de resina acrílica pode ser dependente da presença de hifas, pois a presença de hifas na interface do substrato parece ser essencial para a formação e desenvolvimento da estrutura do biofilme de *C. albicans*. Ambos, o tipo e a rugosidade da superfície, afetam a formação inicial e o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. A organização do biofilme pode estar centrada na rugosidade e na forma de hifa do microrganismo.

He et al (2006) compararam a adesão *in vitro* de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* em quatro diferentes materiais de resina acrílica. Os materiais usados no estudo foram dois termopolimerizáveis (Vertex® e ProBase®) e dois materiais cuja polimerização não libera calor (Paladur A® e Paladur B®). Tiras de todas as resinas foram preparadas de modo que uma superfície lisa fosse obtida e a adesão foi avaliada microscopicamente por meio de um sistema de imagens (analySIS®). Uma diferença significativa na aderência fúngica foi notada entre Vertex® e as outras resinas. Somente *C. glabrata* se ligou ao Vertex®, enquanto que todas as espécies testadas aderiram a todas as outras resinas exceto em ProBase®, a qual resistiu a adesão de *C. krusei*. A aderência de *Candida* ao acrílico base de próteses totais diferiu dependendo da qualidade do acrílico usado e das espécies de *Candida* em questão. Resinas termopolimerizáveis em geral tendem a ter um menor número de leveduras ligadas a sua superfície do que resinas cuja polimerização não libera calor. O autor ressalta a importância de se repetir o trabalho clinicamente, sob condições *in vivo*.

Na cavidade oral humana coexistem mais de 600 espécies de microrganismos. As Interações de sinergismo, de antagonismo e de coagregação entre microrganismos, que compõem a microbiota oral e *Candida* são de extrema importância. Segundo Nikawa et al. (2001), células fúngicas aderem e colonizam as superfícies orais, inclusive a mucosa e próteses totais acrílicas, e têm a capacidade de coagregarem-se com bactérias orais (RAMAGE et al., 2004). Estas coagregações assumem um importante papel na ecologia de biofilmes orais (JEKINSON et al., 1990) e na disseminação de fungos. Recentes pesquisas relatam que várias colônias de bactérias do biofilme, tais como as de *S. sanguis*, *S. alivarius*, *S. mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus* e *Actinomyces naeslundii* coaglutinam com *C.albicans* (MONROY, et al., 2005; NIKAWA et al., 2001).

Nair e Samaranayake (1996) estudaram o efeito de quatro diferentes espécies de bactérias orais (*Streptococcus sanguis*; *Streptococcus salivarius*; *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*) na adesão de *Candida albicans* e *Candida krusei* à superfície de próteses totais acrílicas, por meio de uma análise de adesão *in vitro*. Tiras acrílicas limpas foram inicialmente imersas em diferentes concentrações de suspensões bacterianas e incubadas por 45 a 60 minutos a 37°C; e, posteriormente, foram transferidas para suspensões fúngicas de concentrações diferentes e incubadas por um período similar. Os fungos aderentes foram quantificados usando um sistema de análise de imagens. A pré-exposição a diferentes concentrações bacterianas resultaram na supressão da adesão de *Candida* em vários graus. Das três concentrações bacterianas selecionadas, a exposição à mais alta concentração bacteriana (10^6 organismos/ml) resultou em uma redução mais consistente na adesão de *Candida*, exceto para as combinações de *E. coli* - *C. albicans* e de *S. salivarius* - *C. albicans*. A adesão de *Candida* foi reduzida

significativamente na pré-exposição a *S. sanguis* e *P. gingivalis*, mas não à *E. coli*. Havia também diferenças na adesão relativa entre *C. albicans* e *C. krusei*. Os resultados indicam que a adesão de leveduras às tiras acrílicas é modulada pela quantidade e pela qualidade da microbiota bacteriana pré-existente nas superfícies acrílicas.

Lazarde e Pacheco (2001) identificaram espécies de *Candida* em um grupo de 40 pacientes com candidíase atrófica crônica. Destes pacientes estudados, 40% pertenciam à faixa etária de 51 a 60 anos; 97,5% pertenciam ao sexo feminino e 67,5% usavam próteses totais. Amostras da mucosa do palato destes pacientes foram coletadas, adicionadas em meio Sabouraud e incubadas a 37°C durante 48 horas. Após efetuadas avaliações macroscópica e microscópica, provas de tubo germinativo e de formação de pseudohifas bem como testes de assimilação (ID32C) foram feitos para confirmação dos resultados. A identificação das espécies demonstrou que 72,5% correspondem à *C. albicans*, 15% à *C. tropicalis*, 2% à *C. glabrata* e 1% à *C. parapsilosis*, *C. famata* e *C. rugosa*. O autor ressalta a importância do correto diagnóstico clínico e micológico através da identificação exata das leveduras com a finalidade de estabelecer a terapia correta e evitar a resistência a antimicóticos.

Candido, Azevedo e Ito (1995) estudaram a prevalência de leveduras na cavidade bucal de portadores e de não portadores de próteses totais. Para isto, analisaram 115 amostras de saliva, sendo que destas, 25 eram de indivíduos portadores de prótese total e 90 de indivíduos não portadores de prótese. Leveduras foram isoladas de 59 amostras (51,3%), sendo 18 referentes aos usuários de prótese (72,0%) e 41 referentes aos não usuários de prótese (45,6%). O gênero *Candida* foi isolado de 100% do biofilme das próteses e de 94,4% das salivas dos

portadores de prótese, sendo também detectado em todas as amostras de saliva dos não usuários de prótese. A espécie *C. albicans* foi a prevalente dentre outras, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilhermondii* e *C. famata*. Os resultados obtidos com amostras de saliva foram semelhantes aos do biofilme das próteses, podendo a saliva ser a amostra representativa, por ser mais fácil de ser coletada e manipulada.

Monroy et al. (2005) determinaram a prevalência de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* como colonizadores da mucosa e das próteses dos pacientes com estomatite protética atrófica, a associação entre estes microrganismos e sua relação com outros cofatores clínicos potenciais. Para isto, saliva de 105 pacientes usuários de próteses foi coletada para que seu pH fosse medido. Amostras da membrana da mucosa oral e da superfície interna da prótese de cada paciente foram coletadas para posterior estudo microbiológico. A identificação dos microrganismos foi realizada utilizando-se meios e métodos microbiológicos convencionais. Para o isolamento de *Candida albicans* as amostras foram semeadas em placas contendo meio Ágar Cromógeno CandiSelect; para o isolamento de *S. aureus* foi usado meio Ágar de Chapman ou Ágar-Sal-Manitol; e para o isolamento de *S. mutans*, foi usado o meio Ágar Mitis-Salivarius. Todas as placas foram incubadas a 37°C e foram avaliadas com leituras de crescimento microbiano em 24 horas e em 48 horas. Os resultados mostraram que a estomatite protética atrófica foi observada em 50 pacientes e o pH médio na saliva foi de 5,2. *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* foram isolados em 66,7% dos casos da membrana da mucosa e da prótese, enquanto *S. aureus* e *S. mutans* foram isolados em 49,5% destas mesmas próteses. *C. albicans* foi isolada em 86% das próteses colonizadas por *C. albicans* e *S. aureus*. O autor concluiu que devido à etiologia multifatorial e a cofatores

associados, o gerenciamento terapêutico da estomatite torna-se complicado, posto que biofilmes mistos apresentam diferentes padrões de sensibilidade quando em contato com anti-sépticos, antifúngicos ou antibióticos. O tratamento farmacológico de estomatite deve ser considerado para fungos, tanto quanto para bactérias; sendo que o autor ressalta a importância de se continuar o estudo destas associações microbianas.

A adesão de microrganismos na mucosa do hospedeiro é um pré-requisito para uma colonização bem sucedida e é o papel crítico para o início de muitas infecções fúngicas (PANAGODA et al., 2001; SAMARANAYAKE et al., 1995); tal ocorrência deve-se ao fato de que a adesão impede que o microrganismo seja removido ou desalojado pela ação de limpeza ou por secreções mucosas e, por este motivo, facilita o início de infecções (PANAGODA et al., 2001).

Interações hidrofóbicas estão intimamente envolvidas na aderência de fungos e bactérias nas superfícies das próteses e dos tecidos do hospedeiro (SAMARANAYAKE et al., 1995).

Vários estudos revelam a propensão de diferentes espécies de *Candida* em aderir superfícies mucosas. A hidrofobicidade da superfície celular de certas espécies de *Candida* está intimamente envolvida na colonização inicial das superfícies hospedeiras, desempenhando um significativo papel complementar na modulação destes eventos iniciais (PANAGODA et al., 2001).

Contudo, poucos estudos têm demonstrado o relacionamento entre a hidrofobicidade da superfície de *Candida* e sua aderência ao acrílico da prótese ou às superfícies epiteliais (SAMARANAYAKE et al., 1995). E desses, somente alguns têm investigado esse relacionamento em outras espécies de *Candida* como *C. krusei* (SAMARANAYAKE et al., 1995) ou *C. parapsilosis* (PANAGODA et al., 2001), pois a

maioria dessas pesquisas tem investigado apenas o relacionamento entre a hidrofobicidade e a adesão de *C. albicans* (PANAGODA et al., 2001; SAMARANAYAKE et al., 1995).

Saramanayake et al. (1995) investigaram a hidrofobicidade de 20 cepas de *Candida krusei* e de 5 cepas de *Candida albicans*, e correlacionaram este parâmetro com seus achados prévios sobre a aderência destes microrganismos na prótese total acrílica e nas superfícies epiteliais. O método utilizado para a determinação da hidrofobicidade foi o de análise de separação bifásica (hidrocarbono/ aquosa). Todas as cepas de *C. krusei* demonstraram maior hidrofobicidade que as cepas de *C. albicans*. Diferenças significantivas intra-espécies entre as cepas de *C. krusei* foi encontrada no que tange à hidrofobicidade da superfície celular. Quando a hidrofobicidade de superfície e a adesão às superfícies foram comparadas usando dados de um prévio estudo, houve uma correlação positiva entre a hidrofobicidade da superfície celular e a adesão de cepas de *C. krusei* para superfícies epiteliais, mas não para as superfícies acrílicas. Os dados deste estudo, além de confirmar diferenças inter e intra-espécies na hidrofobicidade da superfície celular de espécies de *Candida*, indicaram que este atributo, junto a outras características da superfície celular, pode determinar o grau de virulência entre diferentes espécies de *Candida*.

Panagoda et al. (2001) investigaram *in vitro*, a aderência de 24 cepas de *Candida parapsilosis* e de 12 cepas de *Candida albicans*, em superfícies acrílicas e em células bucais humanas. A adesão foi correlacionada com a hidrofobicidade relativa da superfície celular destes microrganismos. Não houve diferença significantiva inter-espécies na aderência relativa de cepas de *C. parapsilosis* e de *C. albicans* nas células bucais humanas, apesar de as cepas de *C. parapsilosis* terem demonstrado uma tendência a uma aderência maior. Uma significantiva

variação intra-espécies na aderência entre cepas de *C. parapsilosis* para as células epiteliais bucais foi notada. Cepas de *C. parapsilosis* encontradas na superfície demonstraram maior afinidade às células epiteliais bucais do que as cepas encontradas sistemicamente. Houve uma similar correlação positiva significativa entre a aderência de *C. parapsilosis* para células epiteliais da boca e para superfícies acrílicas das próteses totais. A aderência de células bucais foi correlacionada fortemente com a hidrofobicidade da superfície celular de *C. parapsilosis*. Os resultados sugeriram um íntimo relacionamento entre a aderência e a hidrofobicidade na colonização de *Candida* e que *C. parapsilosis* e *C. albicans* foram igualmente potentes na colonização das superfícies mucosas.

A saliva e o soro são fluidos biológicos de imensa complexidade, que contribuem com interações específicas e não-específicas na colonização fúngica e que modulam a agregação, a aderência e a nutrição dos microrganismos. No entanto, o papel desempenhado pela saliva ou pela película de soro durante o processo de colonização e de formação do biofilme, ainda não é totalmente compreendido. Acredita-se que as proteínas do soro e os componentes da saliva, tais como mucinas e fibrinogênio, modifiquem esse processo quando unidos a blastóporos de *Candida* e a tubos germinativos (NIKAWA et al., 2001; NIKAWA et al., 2000 a; NIKAWA et al., 1997).

Alguns trabalhos mostram que mucinas, glicoproteínas da saliva humana, promovem a adesão de *Candida albicans* à superfície da prótese acrílica, por meio de interações específicas com o açúcar. Há vários relatos que indicam que o açúcar da dieta afeta a aderência de *Candida*, por alterar os componentes da superfície externa da parede celular do fungo (NIKAWA et al., 2001; NIKAWA et al., 2000 a; NIKAWA et al., 1997).

Outros trabalhos, no entanto, mostram que o pré-tratamento de tiras de resina acrílica com saliva resulta na diminuição da aderência inicial de *C. albicans* à prótese total, enquanto que o pré-tratamento com soro permite maior aderência (NIKAWA et al., 2001; NIKAWA et al., 2000 a; NIKAWA et al., 1997).

É evidente, portanto, que a relação entre a película de saliva ou de soro presente na superfície da prótese e a colonização de *Candida* seja algo muito complexo (NIKAWA et al., 2001; NIKAWA et al., 2000 a; NIKAWA et al., 1997).

Nikawa et al. (1997) examinaram *in vitro* o efeito de dois tipos de açúcar (glicose e galactose) na formação do biofilme de *Candida*, em tiras de resina acrílica revestidas por película de saliva ou de soro. Três cepas de *Candida albicans*, duas cepas de *C. tropicalis* e duas de *C. glabrata* foram utilizadas no estudo. O grau de atividade do biofilme foi afetado pela dieta de açúcar e pela natureza da película. Leveduras crescidas em glicose mostraram maior atividade de biofilme que as crescidas em galactose na presença de película, porém nas tiras controle, que foram cobertas apenas com água destilada, leveduras crescidas em galactose apresentaram maior atividade de biofilme que as crescidas em glicose. Os resultados sugerem que a película de saliva ou de soro e a quantidade de carbono no ambiente derivado da dieta do açúcar, atuam como moduladores complexos da formação do biofilme de *Candida*.

Nikawa et al (2001) quantificaram a coadesão de *C. albicans* com bactérias orais pelo uso de bioluminescência adenosina trifosfato (ATP) e investigaram o efeito da dieta de açúcares e da digestão enzimática das células de leveduras na co-adesão. Para isto, leveduras foram pré-incubadas em meio base nitrogênio para leveduras (YNB) suplementado com 250 mM de glicose e em YNB suplementado com 500mM de galactose. Quando foram pré-incubadas no meio

suplementado com glicose, as leveduras coaderiram com *Streptococcus mutans* e com *Streptococcus sanguis*, e nenhuma coadesão significativa foi observada com *Streptococcus sobrinus*, *S. salivarius*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*. Contudo, quando a levedura foi pré-incubada no meio suplementado com galactose, houve sua coadesão com *S. sobrinus*, *S. salivarius* e *Actinomyces* e a coaderência de leveduras com *S. sanguis* foi significativamente reduzida. O teste de digestão enzimática e a análise do PCR revelaram que a coaderência é regulada pela expressão de pelo menos dois tipos de adesinas proteináceas. Os resultados sugeriram portanto que a dieta rica em açúcar pode modificar interações entre *Candida albicans* e bactérias na cavidade oral, particularmente na comunidade do biofilme de próteses, ou seja, pode contribuir para a sobrevivência ou disseminação de fungos para a superfície dos tecidos orais e favorecer a ocorrência de estomatite protética associada à *Candida*.

Os materiais resilientes fornecem um “acolchoamento” entre a base dura da prótese e os tecidos de suporte e são usadas para aliviar as pressões transmitidas pela prótese à mucosa (NIKAWA; YAMAMOTO; HAMADA, 1995; WATERS et al., 1997). Alguns estudos destacam as desvantagens microbiológicas e físicas destes materiais, pois são facilmente colonizados por *Candida albicans* e por outras espécies de *Candida*, que penetram facilmente nestes materiais (NIKAWA; YAMAMOTO; HAMADA, 1995).

A aderência de *Candida*, em superfícies sólidas tais como materiais acrílicos ou materiais resilientes, é o primeiro passo para uma colonização bem sucedida, formação de biofilme e desenvolvimento de patogênese (NIKAWA; YAMAMOTO; HAMADA, 1995).

Embora existam muitos estudos sobre os efeitos destes materiais no crescimento de *Candida*, os resultados são discordantes e controversos. Uns autores consideram que condicionadores de tecido promovem ou permitem o crescimento de *Candida in vivo* ou *in vitro*. Alguns relatam que estes materiais inibem o crescimento de *Candida* por terem um efeito fungicida; e outros relatam que estes materiais não têm efeito sobre o crescimento de *Candida* (NIKAWA; YAMAMOTO; HAMADA, 1995).

Nikawa, Yamamoto e Hamada (1995) investigaram o efeito do tamanho das partículas de pó e do conteúdo de álcool etílico do líquido e o tipo de plastificadores que compõem os materiais resilientes, no crescimento e na colonização de *C. albicans*. Quando comparado com o acrílico, todas as linhas resilientes mostraram efeito inibitório na produção de ácido e no crescimento de *C. albicans*. O efeito antifúngico dos componentes dos materiais resilientes atua na mudança de pH, dependendo do tipo de plastificador. Os dois plastificadores que diminuíram significativamente a taxa de crescimento foram o benzil benzoato (BB) e o benzil salicilato (BS). O efeito inibitório do plastificador pode ser atribuído a sua toxicidade para *Candida*. Os efeitos das partículas de pó foram mínimos, já o conteúdo de álcool etílico do líquido afetou significativamente o crescimento fúngico dependendo do plastificador usado (BS). A avaliação por microscopia eletrônica de varredura revelou que *Candida* na forma de blastóporo colonizou as linhas de materiais de duas formas diferentes dependendo do plastificador usado. Os resultados demonstraram claramente a relação entre componentes de linhas resilientes e a colonização fúngica.

Waters et al. (1997) avaliaram a capacidade de *C. albicans* aderir a dois materiais experimentais e compararam os resultados com aqueles de uma linha de

material resiliente (Molloplast B) e da resina acrílica (Trevalon). Os materiais experimentais consistiam de elastômeros contendo dimetil-polisiloxano, cuja superfície foi tratada com sílica. Amostras de todos os materiais foram confeccionadas em um molde de aço inoxidável e tiveram suas energias de superfícies determinadas por um analisador dinâmico de ângulo de contato. A aderência de *Candida albicans* foi determinada por uma análise *in vitro* e um teste de tensão foi usado para determinar o efeito na aderência de materiais pré-cobertos com saliva filtrada. A aderência de *C. albicans* aos materiais foi dependente da tensão por causa das variações da superfície das células fúngicas, nenhuma relação conclusiva foi encontrada entre a superfície livre de energia dos materiais e o nível de aderência de *C. albicans*. A saliva reduziu a aderência de *C. albicans* em todos os materiais. Contudo, o autor ressalta que a filtração da saliva pode ter reduzido o número de mucinas que auxiliam a aderência de *Candida*. O autor concluiu que a adesão de *C. albicans* nos materiais experimentais foi menor do que na linha de material resiliente e na resina acrílica.

Nikawa et al. (2000 a) pesquisaram *in vitro* as interações entre os materiais resilientes de próteses termocicladas, as películas de soro e *Candida albicans*. Amostras de acrílico e de sete linhas comerciais de materiais resilientes foram utilizadas no estudo. Amostras de cada um dos materiais foram cobertas com saliva ou soro e inoculadas com suspensão fúngica para que a aderência e a colonização de *Candida* fossem promovidas. As amostras controle foram cobertas com água destilada. Todas as amostras foram termocicladas entre 4 e 70°C e a análise de adenosina trifosfato (ATP) foi feita para determinar a quantidade de fungos colonizados nos intervalos de 0, 1000 e 10.000 ciclos térmicos. A colonização variou dependendo do tipo de material resiliente e do número de ciclos

térmicos. As películas de saliva e de soro promoveram a colonização fúngica em linhas resilientes, porém o efeito variou dependendo da cobertura de proteínas e dos materiais usados. O autor sugere que a variação, quanto ao tipo de material resiliente, seja devido à liberação de efeitos antifúngicos de alguns, e que a termociclagem e a cobertura com proteínas promoveram a colonização fúngica por reduzirem esse efeito antifúngico. A interpretação dos resultados mostrou que o tempo de uso dos materiais e os fluidos biológicos do hospedeiro promoveram colonização fúngica nos materiais resilientes, e por este motivo é importante o controle apropriado do biofilme para que materiais resilientes possam ser usados por longo tempo na cavidade oral.

Nikawa et al. (2000 b) investigaram o crescimento de *C. albicans* em linhas comerciais de materiais resilientes termocicláveis, revestidas com película de saliva, ou de soro, ou sem película. Para isto, amostras de resina acrílica (BIORESIN) e de sete linhas comerciais de materiais resilientes foram confeccionadas e termocicladas entre 4 e 70°C. A análise de crescimento foi realizada após 0, 1000 e 10000 ciclos. As amostras de acrílico e de linhas resilientes foram revestidas com película de saliva ou de soro e, após a incubação, suspensões fúngicas foram inoculadas na superfície das amostras que foram então incubadas a 37°C por 2 horas, de modo que a aderência e a colonização fúngica fossem obtidas. A investigação do crescimento foi realizada por meio do monitoramento de mudanças de pH do meio de cultura (caldo Sabouraud) que foi vertido cuidadosamente sobre as amostras, antes de serem incubados por 120 horas. A mudança do pH do referido meio foi medida neste período, com auxílio de um pHmetro. O efeito inibitório dos condicionadores de tecido no crescimento fúngico foi observado usando três parâmetros: o retardo inicial do declínio do pH; a redução da taxa de mudança do

pH; e o pH mínimo alcançado no caso de linhas resilientes controle (não termocicladas e sem película). O efeito antifúngico pareceu depender do tipo de linha comercial resiliente usado. Assim, um retardo inicial no declínio do pH e um pH mínimo muito elevado foram observados em materiais de silicone termopolimerizáveis e naqueles que continham flúor. Um valor elevado de pH mínimo também foi observado em linhas resilientes de acrílico em que a polimerização não libera calor. Contudo, o efeito antifúngico dos materiais foi significativamente reduzido com a termociclagem e com a película de proteína. Os resultados sugeriram que a idade dos materiais e os fluidos biológicos do hospedeiro (particularmente o soro) promovem crescimento fúngico em linhas resilientes de materiais.

A estomatite protética é uma condição patogênica eritematosa da mucosa de assentamento da prótese que envolve principalmente a mucosa do palato (BARBEAU et al., 2003; NIKAWA et al., 2000 b; PARDI et al., 2002; RAMAGE et al., 2004).

Esta doença apresenta diferentes graus de severidade variando de petéquias à inflamação generalizada com hiperplasia papilar. O diagnóstico é usualmente feito após a observação da inflamação na mucosa do palato (BARBEAU et al., 2003). Barbeau et.al. (2003) relataram que a primeira classificação da estomatite foi descrita no trabalho de Newton em 1962 e que outras classificações derivadas do método original de Newton foram propostas por Budtz-Jorgensen e Bertram em 1970 e por Bergendal e Isacson em 1983.

A maioria dos pacientes desconhece o problema, apenas se queixa da sensação de queimação, desconforto, gosto ruim, etc (RAMAGE et al., 2004).

A estomatite protética é mais comum em mulheres e idosos (MONROY et al., 2005; PIRES et al., 2002). Monroy et al. (2005) relataram que mulheres são mais propensas a essa doença provavelmente devido a mudanças hormonais que ocorrem no período da menopausa, a qual pode refletir na microbiota oral. A idade avançada está associada ao desenvolvimento de doenças sistêmicas e mudanças de hábitos nutricionais e higiênicos, além de alterações na composição salivar (MONROY et al., 2005).

A etiologia da estomatite protética é multifatorial (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; LANFON et al., 2005; NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998; PARDI et al., 2002; PIRES et al., 2002; RAMAGE; TOMSETT.; WICKES., 2004). Fatores predisponentes ao desenvolvimento da estomatite incluem: trauma de próteses totais (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARNABÉ et al., 2004; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; PARDI et al., 2002; PIRES et al., 2002; RAMAGE; TOMSETT; WICKES, 2004); idade (BARBEAU et al., 2003); declínio do sistema imune (BARBEAU et al., 2003; PIRES et al., 2002); doenças sistêmicas (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; PARDI et al., 2002; PIRES et al., 2002); fumo, tempo de uso da prótese (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; RAMAGE et al., 2004); uso contínuo de próteses, reação alérgica ao material base da prótese (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; PARDI et al., 2002; RAMAGE et al., 2004); redução do fluxo salivar (BARBEAU et al., 2003; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; PIRES et al., 2002; RAMAGE; TOMSETT; WICKES, 2004); presença de biofilme nas próteses (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; PARDI et al., 2002); alterações de pH do biofilme

(BARBEAU et al., 2003; BUDTZ-JORGENSEN 1974; LANFON et al., 2005; PIRES et al., 2002; RAMAGE et al., 2004); dieta inadequada (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; PARDI et al., 2002; RAMAGE et al., 2004); uso de antibióticos (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARNABÉ et al., 2004; PARDI et al., 2002); uso de esteróides por tempo prolongado, rugosidades e microporosidades da superfície da resina acrílica (PIRES et al., 2002); higiene precária (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; PARDI et al., 2002; PIRES et al., 2002) e a presença de *Candida albicans* (ANDRUCIOLI et al., 2004; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; LANFON et al., 2005; NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998; PARDI et al., 2002; WATERS et al., 1997).

A higienização deficiente da prótese é um fator predisponente de grande relevância, visto que facilita a presença de *Candida* e de bactérias na saliva e sua colonização na mucosa oral e nas superfícies da prótese (PIRES, 2002; WEBB et al., 1998 b). A relação entre higiene precária de próteses totais e estomatite protética vem sendo estudada desde o trabalho de Budtz-Jorgensen e Bertram em 1970, em que foi verificado que a manutenção de higiene de próteses totais por pacientes que não apresentavam alterações clínicas foi superior à manutenção do grupo controle com candidíase atrófica crônica. A presença de inflamação foi significativamente proporcional à má higiene. A higienização adequada de próteses totais favorece a regressão desse processo (BARBACHAN et al., 1995; BUDTZ-JORGENSEN, 2000; GRIMOUD et al., 2005; SALLES, 2006; WILSON, 1998).

No entanto, perante tantos fatores, o microbiano é o mais importante (BARBEAU et al., 2003; NIKAWA et al., 2000 b; WATERS 1997). *Candida albicans* é considerada o agente etiológico primário da estomatite (ANDRUCIOLI et al., 2004;

BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; LANFON et al., 2005; NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998; PARDI et al., 2002; WATERS et al., 1997).

Na cavidade oral, o estágio principal da estomatite se inicia com a adesão de *Candida* às células epiteliais da mucosa, seguido por crescimento e invasão tecidual (BARNABÉ et al., 2004).

Estudos têm concluído que a estomatite está associada com o crescimento de *Candida* em biofilme de próteses, e não na mucosa do palato, sugerindo que o tratamento deveria ser direcionado para a prótese total (BARNABÉ et al., 2004). Afinal, a superfície da prótese atua como reservatório de *C. albicans* na estomatite (NAIR; SAMARANAYAKE, 1996; NIKAWA et al., 2000 b; WATERS et al., 1997).

Assim como nesses estudos, o de Catalan, Herrera e Martinez (1987) e o de Olsen (1974) mostraram que a contaminação das próteses por leveduras são geralmente encontradas em maior quantidade na superfície das próteses superiores do que na mucosa, indicando também que o acrílico serve de reservatório para estes microrganismos e que estes podem ser reinoculados na mucosa palatina.

Na patogênese da estomatite, o elevado crescimento de *Candida* na superfície de assentamento da prótese e a produção de ácido por leveduras são de importância significativa; embora a citotoxicidade direta, a ativação da proteinase ácida, a produção de fosfolipase e a promoção de aderência de *Candida* também sejam relevantes (NIKAWA et al., 2000 a).

Embora *C. albicans* seja, de longe, a cepa predominante para esta condição, outras espécies de *Candida* tais como *C. tropicalis* e *C. glabrata* também podem ser freqüentemente isoladas das superfícies da prótese acrílica e da mucosa palatina (NIKAWA et al., 1997)

Budtz-Jorgensen et al. (1974) determinaram a prevalência de estomatite protética em uma população geriátrica usuária de próteses e avaliaram a frequência de espécies de leveduras e sua concentração. 463 pacientes dinamarqueses, usuários de próteses totais ou parciais, com idade média em torno de 74,5 anos, participaram do estudo. Após o exame oral, os pacientes foram divididos ao acaso em dois grupos, sendo o grupo 1 constituído de 291 usuários de próteses com estomatite protética; e o grupo 2, constituído de 172 usuários de próteses com mucosa palatina normal. Leveduras alojadas na mucosa palatina e na superfície interna das próteses superiores foram isoladas com o auxílio de swabs orais; e para o cultivo, a semeadura foi realizada em ágar glicose sabouraud. *C. albicans* foi identificada por meio da verificação de formação de pseudohifas. Imagens da mucosa e da prótese foram analisadas em microscópio. A prevalência de estomatite foi de 65%. Leveduras, especialmente *C. albicans*, foram encontradas na maioria dos usuários de próteses com estomatite (grupo 1) ou com mucosa palatina normal (grupo 2). Contudo, um grande acúmulo de hifas e células inflamatórias foram encontradas em 65% dos pacientes do grupo 1 e em 14% dos pacientes do grupo 2. No entanto a contaminação bacteriana foi maior no grupo 2 do que no grupo 1. O estudo revelou que a infecção por *Candida* e a higienização deficiente das próteses são quadros bastante comuns em idosos usuários de próteses.

Budtz-Jorgensen; Theilade (1983) investigaram se havia diferenças na taxa de formação de biofilme na prótese e se a proporção de leveduras e de bactérias na composição do biofilme da prótese variava de um local para outro. O estudo foi realizado no período de uma semana de acúmulo de biofilme em pedaços de fitas adesivas circulares, que foram aplicadas na superfície interna das próteses totais superiores. As fitas foram aplicadas em cinco localizações bem definidas: 4 na

superfície interna das próteses e uma no flanco bucal. Quinze pacientes com estomatite protética e com a maior parte da mucosa maxilar afetada participaram do estudo. Não houve diferença significativa na quantidade de bactérias das diferentes áreas, embora as variações entre os pacientes tenham sido significativas. A quantidade de leveduras localizadas no flanco bucal da prótese foi significativamente menor que as localizadas na superfície interna da prótese. Por outro lado, não houve variação na quantidade de leveduras entre as áreas testes da superfície interna das próteses. Quantidades fúngicas maiores ou iguais a $10^3/\text{cm}^2$ foram obtidas da superfície interna de 12 das 15 próteses. Os resultados indicaram que sob condições do ambiente, a base da prótese fica predisposta à colonização fúngica que é diferente daquela presente no flanco bucal.

Budtz-Jorgensen, Theilade e Theilade (1983) compararam a taxa de formação de biofilme microbiano em próteses de pacientes com e sem estomatite protética, e logo após realizaram um estudo quantitativo das leveduras e bactérias presentes. O estudo foi desenvolvido durante sete dias de acúmulo de biofilme em finas fitas que foram aderidas na superfície interna das próteses. 44 pacientes edêntulos, usuários de próteses totais superiores, participaram do estudo, sendo que 17 pacientes apresentavam mucosa oral saudável e 27 apresentavam estomatite protética. O número mais elevado de leveduras e bactérias foi encontrado em pacientes com estomatite, isto indica que a taxa de formação do biofilme é maior nestes pacientes. Leveduras constituíram menos de 1% da quantidade de bactérias anaeróbicas da microbiota oral tanto nos pacientes com estomatite quanto nos pacientes sem estomatite; no entanto a sua percentagem foi significativamente maior em pacientes com estomatite. Há que se ressaltar que houve uma correlação significativa entre a elevada quantidade de leveduras antes do tratamento

antimicótico e a melhora da condição clínica da mucosa do palato após este tratamento. Em alguns pacientes, apenas bactérias cresceram e o tratamento não teve efeito. O estudo sustentou a hipótese de que antígenos fúngicos e toxinas do biofilme protético são fatores importantes para o início e para a manutenção da estomatite protética. Contudo, bactérias também podem estar envolvidas como patógenos.

Pires et al. (2002) analisaram o fluxo salivar, a contagem de espécies de *Candida* e sua associação à estomatite protética em usuários de próteses antes e após 6 meses da instalação de novas próteses totais. 77 pacientes participaram do estudo. Um exame clínico para classificar a estomatite protética segundo a classificação de Newton foi realizado e a saliva de cada paciente foi coletada para que o fluxo salivar fosse medido e para que a contagem e a identificação de espécies de *Candida* fossem realizadas. Todos os pacientes receberam instruções para que não utilizassem nenhum medicamento contra a estomatite. Os resultados mostraram que 50,6% dos pacientes apresentaram estomatite protética na primeira avaliação; já na segunda avaliação, a percentagem de pacientes com estomatite diminuiu para 18,2%. A estomatite foi mais freqüente em mulheres em ambas as avaliações. *Candida albicans* foi a espécie isolada mais comum, correspondendo a 50% das amostras; outras espécies também foram isoladas, dentre estas: *C. tropicalis*; *C. krusei*; *C. parapsilosis* e *C. glabrata*.. Todos os pacientes com estomatite apresentaram *Candida* na saliva. Contudo, o autor ressalta que a estomatite protética também pode se desenvolver em pacientes que não possuem *Candida* na saliva e que não necessariamente se desenvolverá em pacientes com *Candida* na saliva. *Candida* foi encontrada na saliva de 84,4% e 79,2% dos pacientes na primeira e na segunda avaliação, respectivamente. Embora o número

de pacientes com estomatite protética tenha diminuído após a instalação de novas próteses, a quantidade de *Candida* na saliva permaneceu similar. O autor concluiu que a persistência de um número elevado de *Candida* na saliva após a instalação de novas próteses é um importante fator predisponente à ocorrência de estomatite; e que portanto instruções de higiene de próteses e a motivação do paciente são fundamentais para que ele mantenha uma adequada higiene oral e previna a estomatite protética.

Barbeau et al (2003) reavaliaram a relação entre *Candida albicans* e estomatite protética de acordo com a classificação de Newton modificada, a qual refletia os tipos clássicos de inflamação e a extensão dos tecidos afetados. O estudo foi constituído de duas partes. Na primeira parte, réplicas da superfície interna de 47 próteses totais foram obtidas por meio da moldagem destas superfícies com meio de cultura. Após o período de incubação, as réplicas foram fotografadas para que as colônias fossem contadas. Na segunda parte do estudo, amostras foram coletadas da porção palatina de 21 próteses e após os devidos procedimentos microbiológicos, a contagem de leveduras foi realizada. A identificação de espécies isoladas foi efetuada em ambas as partes do estudo. Os resultados mostraram que a presença de leveduras nas próteses está provavelmente relacionada à extensão da inflamação, que *C. tropicalis* e *C. glabrata* co-colonizam mais facilmente com *C. albicans* e que o uso noturno de próteses e o hábito de fumar estão associados à inflamação extensa. O autor concluiu que a modificação da classificação de Newton por ele empregada pode explicar algumas contradições encontradas na literatura, e que uma classificação mais padronizada e clara é necessária para que o diagnóstico e o gerenciamento de infecções de *Candida* sejam realizados de forma mais adequada. Ele sugeriu a hipótese de que a inflamação possa estar presente antes

da colonização de *Candida*, o que para ele pode explicar os resultados variáveis do tratamento de estomatite protética com apenas antifúngico. Além disso, sugeriu ainda que a adição de uma medicação anti-inflamatória talvez possa levar a um melhor controle das lesões, no entanto ressalta que mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Ramage et al. (2004) descreveram o biofilme oral de *Candida* associado com estomatite protética *in vivo* e avaliaram características da formação do biofilme associado à *Candida in vitro*. Para o estudo *in vivo*, amostras do biofilme de próteses totais de pacientes com estomatite protética foram coletadas e analisadas em microscópio eletrônico de varredura. Para o estudo *in vitro*, amostras do tecido eritematoso do palato duro destes pacientes foram coletadas e analisadas microbiologicamente para que a cinética do desenvolvimento do biofilme fosse investigada. A susceptibilidade do biofilme a antifúngicos foi posteriormente testada. Os resultados mostraram que o biofilme de *C. albicans* tem maior propensão em aderir ao longo das imperfeições da prótese acrílica; e que *Candida* isolada clinicamente foi capaz de formar biofilme *in vitro*, embora diferenças na extensão da formação do biofilme fossem observadas para diferentes colônias isoladas, presentes no mesmo paciente. O teste de susceptibilidade indicou que o biofilme resultante mostrou uma maior resistência ao tratamento antifúngico e que a presença de soro e de saliva aumentaram a aderência inicial de *Candida*, mas que, no entanto, tiveram pouco efeito na formação geral do biofilme. Os autores concluíram que a formação de biofilme de *Candida* nas próteses pode contribuir para o processo da doença em pacientes com estomatite protética.

2.3 Estreptococos do grupo mutans

Mais de 600 espécies microbianas coexistem na cavidade oral, sendo que o *Streptococcus sp* é um dos microrganismos predominantes no biofilme inicial.

Os estreptococos são bactérias gram-positivas, cuja parede celular consiste de muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida (MURRAY, 2002).

Os estreptococos do grupo mutans são importantes fatores etiológicos, envolvidos no desenvolvimento da cárie dental. Estas bactérias estão freqüentemente presentes na cavidade oral, e sua patogenicidade está relacionada a sua acidogenicidade e capacidade de formar polissacárides extracelulares insolúveis (NARHI et al., 1994 a).

O grupo *mutans* apresenta espécies antigênica e geneticamente heterogêneas, originando várias linhagens desses microrganismos, as quais permitiram o conhecimento de diferentes biotipos envolvendo este grupo de bactérias. Essas têm sido as bactérias da cavidade oral mais intensamente estudadas nas últimas décadas, sendo atualmente conhecidas sete espécies e oito sorotipos correspondentes ao grupo *mutans*. As espécies que se destacam em maior número de colônias isoladas a partir de amostras salivares são os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. O *Streptococcus mutans* apresenta a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares aderentes, a partir da sacarose, e polissacarídeos intracelulares a partir de carboidratos fermentáveis. Pode ser prontamente identificado em meios de cultura sólidos (com altas concentrações de sacarose), onde forma colônias elevadas e irregulares. O *Streptococcus sobrinus* é uma espécie que sorologicamente reage com os anti-soros para *S. mutans* sorotipos d ou g³ (HÖFLING et al., 1999).

Estes microrganismos sintetizam glucans adesivos a partir da sacarose, por meio da ação de glicosiltransferases. O glucan é responsável por mediar a aderência destas células às superfícies (OOSHIMA et al., 2001).

A adesão de microrganismos às superfícies sólidas biológicas e não biológicas da cavidade oral é um pré-requisito para a formação de biofilme, que, por sua vez, pode levar ao desenvolvimento de infecções locais, tais como cárie dental e doenças periodontais, como também de doenças sistêmicas e de endocardite (TANNER et al., 2001). As próteses, assim como os dentes, possuem superfícies irregulares e duras, passíveis de acumular biofilme e cálculo (MORGAN, 2001; NEILL, 1968). A colonização bacteriana das superfícies sólidas na cavidade oral é rápida e ocorre como consequência da proliferação de bactérias já aderidas e da deposição contínua de bactérias pela saliva.

Vários mecanismos de adesão de bactérias a substratos sólidos têm sido apontados, dentre eles a ligação específica entre componentes complementares da superfície e da bactéria, e características físico-químicas da superfície tais como carga, hidrofobicidade e parâmetros termodinâmicos. A adesão inicial de *S. mutans* em substratos inertes ocorre principalmente devido a interações eletrostáticas. As células também se ligam à película salivar e, na presença de sacarose, a glicosiltransferase e os polissacarídeos extracelulares atuam como mediadores no processo de adesão (TANNER et al., 2000).

No entanto, pouco se sabe sobre a aderência de *S. mutans* ao polímero base de próteses (TANNER et al., 2000).

Alguns estudos relatam que as proteínas salivares, principalmente as mucinas, que recobrem a mucosa oral e as superfícies internas das próteses

dentárias, podem atuar como receptores específicos de *C. albicans* e de outros microrganismos (MONROY, 2005).

Adesinas presentes nas superfícies de microrganismos orais são consideradas necessárias para o crescimento e para a sobrevivência destes na boca. As propriedades de aderência dos *Streptococcus* são bem caracterizadas e capacitam este microrganismo a aderir à película salivar (JEKINSON, 1990).

A adesão bacteriana inicial é controlada por vários fatores físico-químicos, como força de Van der Waals e forças eletrostáticas. A energia livre de superfície e a hidrofobicidade da superfície aderente também participam deste processo. A adesão inicial de *S. mutans* é predominantemente definida por forças eletrostáticas. Proteínas salivares medeiam a adesão na presença da película adquirida. A aderência inicial das bactérias é seguida pela colonização e pela formação do biofilme. Na presença de sacarose, os *S. mutans* usam glicosiltransferase e os polissacarídeos extracelulares como mediadores para a formação do biofilme (TANNER et al., 2001).

Apesar de muitos estudos já terem sido realizados em população humana, pouca informação existe sobre a prevalência de *Streptococcus* na saliva de idosos (NARHI et.al., 1994 b).

MARSH et al. (1992) determinaram os efeitos do uso de próteses e da idade na prevalência de bactérias de significância dental e na ocorrência de patógenos oportunistas no biofilme de molares e na saliva. 120 indivíduos saudáveis participaram do estudo, sendo que 41 destes eram usuários de próteses parciais removíveis e 22 usavam próteses em ambos os maxilares. Os participantes foram divididos em 4 grupos de idades: 20-39 anos (grupo A), 40-59 anos (grupo B), 60-79 anos (grupo C), e ≥ 80 anos (grupo D). Saliva e amostras de biofilme supragengival

do primeiro molar inferior dos participantes foram colhidas. Diluições decimais de saliva foram preparadas e uma pequena quantidade de cada uma delas foi semeada em meios específicos para a determinação do número de anaeróbios, de *Candida sp*, de bactérias entéricas, de *Lactobacillus*, de *Staphylococcus* e de *Streptococcus mutans*. As amostras do biofilme foram semeadas em meios específicos para a quantificação de *Actinomyces viscosus* e *Actinomyces naeslundii*, de Gram negativos anaeróbios, de Enterobactérias e de Espiroquetas. As proporções e a freqüência de isolamento das leveduras e de *Lactobacillus* na saliva e no biofilme foram maiores em usuários de próteses parciais; já as proporções de *Staphylococcus* e de *Streptococcus mutans* foram maiores em usuários de próteses totais. O aumento do número de fungos e de *Lactobacillus* na saliva foi diretamente proporcional à idade, no entanto diferença estatisticamente significante foi encontrada somente em usuários de próteses do grupo D e nos participantes do grupo controle A. A freqüência de isolamento de fungos no biofilme foi significativamente maior em usuários de próteses com idade mais avançada (grupo D). *A. viscosus* predominaram sobre *A. naeslundii* em grupos de idade mais avançada. Espiroquetas e anaeróbios pigmentados de preto foram encontrados em menor quantidade nos usuários de próteses. Os dados mostraram que componentes da microbiota oral, em adultos, podem ser influenciados tanto pela idade como pelo uso de próteses.

Narhi, Ainamo e Meurmann (1994 a) determinaram a prevalência de *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus* e sua relação com o fluxo salivar, com o tipo de dentição, com o uso de medicamentos e com a doença do paciente. Para isto, a saliva de indivíduos idosos habitantes de Helsinki na Finlândia, com idade de 76, 81 e 86 anos, foi coletada e o fluxo salivar foi medido. Os participantes do

trabalho foram classificados, de acordo com os medicamentos que utilizavam e com suas doenças, em 4 grupos conforme a dentição: presença de dentes naturais; presença de prótese parcial removível ou prótese total associada a dentes naturais; pacientes edêntulos usuários de prótese total; e pacientes edêntulos sem próteses. O número de *Streptococcus mutans* na saliva foi estimado pelo “Dentocult-SM strip mutans method”. A tira teste deste método foi rotacionada na superfície da língua do paciente, colocada em caldo com Bacitracina e incubada a 37°C por 2 horas. O número de bactérias/mL de saliva foi determinado por meio da comparação da densidade de colônia da tira teste com o mapeamento da densidade modelo do fabricante. A presença de *Lactobacillus* foi avaliada pelo método “Dentocult LB” em que a saliva estimulada foi espalhada em cada lado das tiras, as quais foram então incubadas por 4 dias. A densidade de colônia das tiras foi comparada com um mapeamento da densidade fornecido pelo fabricante. Um abundante crescimento de *S. mutans* na saliva foi encontrado em 62% dos participantes. Um número mais elevado de *S. mutans* foi encontrado em indivíduos com 81 anos de idade (69%) e em usuários de próteses totais (68%), ao passo que em relação aos indivíduos que tinham dentes naturais este percentual foi menor (53%). Um grande número de *Lactobacillus* foi encontrado em 44% dos participantes que usavam prótese parcial removível e em 39% dos participantes que tinham dentes naturais. Nenhum grupo de doença específica e nenhum medicamento por si só, favoreceu o crescimento de *S. mutans* ou *Lactobacillus* no estudo. O autor concluiu que o abundante crescimento de *S. mutans* e de *Lactobacillus* está relacionado com a baixa capacidade tampão que, por sua vez, está relacionada com a baixa taxa de fluxo salivar. Assim, com o aumento da idade, o efeito cumulativo de múltiplas doenças e

medicamentos levam ao decréscimo do fluxo salivar, facilitando a colonização da cavidade oral por microrganismos.

Narhi, Ainamo e Meurmann (1994 b) determinaram os níveis normais de componentes salivares como: IgA, IgG, lisozima, lactoferrina, mieloperoxidase, peroxidase salivar, amilase, ácido siálico, e proteína total; e estudaram a correlação desses componentes com a taxa de fluxo salivar estimulada por parafina e com a capacidade tampão em um grupo de indivíduos idosos saudáveis. Além disso, analisaram a relação entre fatores de defesa salivar e a saúde gengival, tipo de dentição, a presença de *S. mutans*, *Lactobacillus* e leveduras na saliva. 71 pacientes, com 76, 81 e 86 anos de idade participaram do estudo. 67 destes pacientes não usavam medicamentos e 4 usavam remédios sem nenhuma significância oral. Os participantes foram classificados em três grupos de acordo com o tipo de dentição: pacientes edêntulos usuários de próteses totais; pacientes com prótese parcial removível associada a dentes naturais e pacientes que tinham dentes naturais. A contagem de *Streptococcus mutans* na saliva estimulada foi determinada pelo método “Dentocult - SM strip mutans method” no qual o número de bactéria/mL de saliva foi estimado por meio da comparação da densidade de colônia da tira teste com o modelo de mapeamento de densidade do fabricante. A presença de *Lactobacillus* na saliva e de leveduras também foi estimada. Correlações negativas estatisticamente significantes existiram entre a taxa de fluxo e os componentes salivares pesquisados (IgA, lisozima, lactoferrina, ácido siálico e proteínas). As concentrações de ácido siálico e de peroxidase salivar foram mais elevadas no grupo com idade mais avançada. A concentração de IgA total foi mais elevada em mulheres do que em homens, no entanto os homens mostraram concentrações mais elevadas de ácido siálico e da relação entre ácido siálico e

proteínas. Indivíduos com saúde gengival precária apresentaram maiores concentrações de proteína do que aqueles sem nenhuma necessidade de tratamento periodontal. Indivíduos edêntulos usuários de prótese total apresentaram menores concentrações de IgG, lactoferrina e mieloperoxidase do que indivíduos com dentes naturais. As concentrações de IgA, de IgG, de lisozima e de mieloperoxidase foram mais altas em pacientes que apresentavam maior crescimento de *Lactobacillus* na saliva do que em indivíduos que não apresentavam tal crescimento. Nenhuma associação entre fatores antimicrobianos salivares e a presença de *Streptococcus mutans* na saliva foi observada. O autor concluiu que as concentrações de agentes antimicrobianos na saliva não diminuem com a idade, em idosos que não usam medicamentos.

Tanner et al. (2000) avaliaram *in vitro* a aderência de *S. mutans* à superfície do polímero base de dentaduras e fibras E-Glass usadas em próteses e compararam com a aderência bacteriana à superfície de outros materiais restauradores. Os materiais foram estudados com e sem uma película de soro ou de saliva da glândula parótida. Amostras dos materiais estudados (E-glass, polímero base de próteses, titânio, liga de cobalto-cromo, liga de ouro e cerâmica feldspato) foram incubadas em uma suspensão de *S. mutans*, para que a adesão inicial ocorresse. O grau de adesão bacteriana foi estudado usando um microscópio eletrônico de varredura (SEM). Os materiais estudados não cobertos com película mostraram similar adesão de *S. mutans*. A cobertura com película de saliva resultou na diminuição da aderência para todos os materiais, exceto para as fibras de vidro. Com a película de saliva, o E-glass mostrou a maior capacidade de ligar-se ao *S. mutans* e diferiu significativamente dos outros materiais estudados. A película de soro diminuiu a adesão a todos os materiais, e somente uma mínima diferença entre

os materiais estudados foi observada. Os resultados deste estudo sugerem que as restaurações estudadas foram similares no que tange à adesão de *S. mutans* e que a película de saliva pode promover adesão de *S. mutans* em fibras de vidro.

Tanner et al. (2001) determinaram *in vitro* o efeito do armazenamento de compósitos reforçados com fibras (FRC) em água, na adesão de *S. mutans* e a capacidade deste microrganismo aderir e se multiplicar em FRC. Os materiais (fibras E-glass e polímero base para dentaduras) foram armazenados em água por 14 ou 30 dias ou deixados secos. O ângulo de contato da água foi determinado. Amostras testes sem cobertura de película e amostras com cobertura de película de soro ou de saliva (da glândula parótida) foram incubadas em uma suspensão de *S. mutans* de modo que uma adesão inicial ocorresse. A adesão e multiplicação bacterianas foram estudadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os ângulos de contato dos materiais foram significativamente reduzidos após o armazenamento em água, indicando um aumento na energia livre de superfície. Quando estudados sem a película de superfície, o armazenamento em água aumentou significativamente a adesão de *S. mutans* para o vidro e para o polímero; por outro lado, as amostras do grupo controle, que foram mantidas secas, tiveram o mais baixo número de bactérias aderidas. O mais alto número de *S. mutans* aderido foi observado nas amostras revestidas com película de saliva, e o grau mais elevado de adesão foi encontrado nas fibras de vidro, principalmente após 14 dias de armazenamento. A cobertura com película de soro resultou em baixos números de células aderidas para todos os materiais. Os resultados sugerem que para evitar um possível aumento de *S. mutans* deveriam ser feitas modificações nas propriedades da superfície das fibras de vidro, como por exemplo, a cobertura das fibras com a matriz polimérica do compósito.

Monroy et al. (2005) determinaram a prevalência de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* como colonizadores da mucosa e das próteses de pacientes com estomatite protética atrófica, e a relação existente entre estes microrganismos e outros fatores clínicos. Para isto, saliva de 105 pacientes usuários de próteses foi coletada para que seu pH fosse medido. Amostras da membrana da mucosa oral e da superfície interna da prótese de cada paciente foram coletadas para posterior estudo microbiológico. Os resultados mostraram que a estomatite protética atrófica foi observada em 50 pacientes e o pH médio na saliva foi de 5,2. *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* foram isolados em 66,7% das amostras de membrana da mucosa oral e das amostras de prótese, enquanto que *S. aureus* e *S. mutans* foram isolados em 49,5% destas mesmas amostras.

2.4 Agentes Físicos e Químicos de Higienização de Próteses.

2.4.1 Agentes Físicos

A limpeza mecânica da prótese total consiste na utilização da escovação com escova convencional ou elétrica combinada com alguns agentes auxiliares e no uso de ultra-som.

2.4.1.1 Escovação

A escova de dente tem sido e ainda é o elemento mais importante em qualquer programa de higiene. Isto é verdade para a higienização de próteses totais, sendo que o essencial é o emprego de uma escova adequada, isto é, uma que se adapte corretamente ao contorno da prótese.

A maior vantagem desse método de higiene é a limpeza rápida, mas este fator é sobrepujado pela desvantagem da perda de polimento pelo desgaste abrasivo das resinas acrílicas, incapacidade de alcance de áreas retentivas e a possibilidade de queda ou dano ao aparelho durante a escovação (PEDRAZZI, 1996).

Este método de higienização é o mais popular perante os pacientes usuários de próteses totais, e é conhecido principalmente em associação com dentifrícios abrasivos.

A abrasão da superfície acrílica é um fator negativo dos dentifrícios comuns, que resulta no desgaste excessivo e deterioração do acrílico com o aparecimento de ranhuras que propiciam a agregação de resíduos e microrganismos (HARRISON; JOHNSON; DOUGLAS, 2004).

A higiene oral do idoso é deficiente. Segundo Abelson (1981), a escovação da dentadura com uma pasta abrasiva pode ser o método mais efetivo, mas também é o mais difícil, principalmente para pacientes idosos e incapacitados. Fatores que podem contribuir para a higiene deficiente incluem a pobre coordenação motora e resistência muscular enfraquecida de suas mãos.

Segundo Abere (1979) uma escova de boa qualidade deveria ter 2 grupos de cerdas, uma para permitir acesso a superfície interna da prótese e outro disposto de tal maneira a formar uma escova retangular para adaptação a superfície externa e oclusal da prótese.

Para Paranhos (1996), uma escova apropriada para a higienização de próteses totais, caracteriza-se basicamente por uma escova de cabo menor (plano ou cilíndrico), tendo o conjunto de tufos de fibras seguindo a mesma direção do cabo e este tufo formando um cilindro de pequeno diâmetro terminando em cone. As

fibras centrais do tufo devem ser mais longas que as demais, com aproximadamente 22 mm de comprimento. As fibras devem ser mais grossas, mais rígidas e mais longas que aquelas das escovas para dentes naturais. O modelo de escova com cabo cilíndrico, isto é, tubular e oco oferece várias vantagens: 1º) Permite uma limpeza adequada e completa de todas as zonas internas e externas da prótese total, devido ao fato de o cabo não ser perpendicular às fibras e não esbarrar contra as paredes ou bordas da prótese; de as fibras serem mais longas que as fibras de escovas para dentes naturais; de o conjunto de tufos de fibras formarem uma espécie de cilindro e de as fibras centrais serem mais longas que as demais. 2º) Impede qualquer tipo de acidente, pois pode ser manuseada como um lápis ou como um pincel e fica sob completo domínio das mãos do paciente. 3º) Pode ser levada em qualquer lugar devido ao seu pequeno tamanho (quase metade das escovas para dentes naturais).

O critério mais importante é que o paciente deva ser capaz de limpar todas as superfícies da prótese. E a escova deve ser de cerdas macias de modo a evitar o desgaste e o aparecimento de rugosidades nas superfícies da prótese total.

Estudos incluindo avaliações de escovas específicas para higienização são escassos. Levando em consideração as dificuldades dos pacientes idosos, alguns autores indicam modificações nas escovas.

Makila e Taulio-Korvenmaa (1988) compararam a eficiência de uma escova específica para dentadura com a de uma escova convencional. Participaram do experimento 34 pacientes usuários de prótese total superior. Os resultados mostraram que após um minuto de escovação com escova teste e com a escova convencional, observou-se a presença de biofilme em 9 e 31 próteses, respectivamente. Mesmo obtendo-se superioridade na higienização com escova

teste, 28 pacientes preferiram a escova convencional relatando alta flexibilidade da escova teste e da dificuldade de pressioná-la contra a prótese. Entretanto, segundo os autores, a escova teste não precisa ser pressionada contra a superfície da prótese, o que é uma vantagem para uso em conjunto com um aparelho elétrico. Além disso, ela se encaixa fácil e confortavelmente na mão e, sua forma cônica e curva, possibilita a escovação de sulcos profundos e estreitos.

Cabe ressaltar que escovas elétricas também existem no mercado. A escovação com escova elétrica tem sido apresentada como opção, principalmente para pacientes com dificuldades motoras e cognitivas (CIANCIO, 2002). No entanto o custo destas escovas é mais elevado do que o de escovas manuais.

Carter et al. (2001) avaliaram, por um período de seis meses, a eficiência de uma escova elétrica comparativamente à manual. A população investigada não recebeu orientações prévias em relação à escovação a fim de que fosse possível também verificar a segurança no uso da escova elétrica. Para avaliação foram utilizados parâmetros clínicos como profundidade de sondagem e sangramento, recessão gengival, nível de inserção clínica, índice de placa, índice de cálculo e presença de manchas. De acordo com os resultados deste estudo, a escovação com escova elétrica pode ser usada com segurança e promove benefícios adicionais em relação à manual, na redução dos índices de cálculo e placa.

Em uma avaliação clínica de pacientes idosos com próteses inferiores implanto-muco-suportadas, Tawse-Smith et al. (2002) observaram que as escovas elétricas e manuais foram igualmente eficientes no controle do biofilme supragengival e inflamação tecidual. Dentino et al. (2002), em um estudo *in vitro*, verificaram a eficiência de diferentes marcas de escovas elétricas na remoção de biofilme artificial em superfícies de vidro, empregando força de 1N ou 2N, durante 10

segundos. Seus achados indicaram que o padrão de remoção do biofilme variou de acordo com o formato da cabeça e que a força de 2N causou deformação nas cerdas de algumas escovas, alterando a remoção do biofilme da lâmina de vidro.

2.4.1.2 Ultra-som

Um método alternativo para a remoção do biofilme de próteses removíveis consiste no desenvolvimento de um sistema efetivo de limpeza mecânica. Tais sistemas incluem vibradores sônicos e aparelhos ultra-sônicos.

Os higienizadores ultra-sônicos têm sido utilizados extensivamente na Odontologia, não apenas para a limpeza de rotina, mas também para a descontaminação de instrumentos e brocas. O aumento do uso de higienizadores ultra-sônicos pelos dentistas resultou na proliferação destes produtos, contudo eles são um conceito relativamente novo em relação aos cuidados com as próteses totais.

Segundo Pitt e Ross (2005), o ultra-som possui dois mecanismos de ação, o primeiro se refere à movimentação do líquido, decorrente da transferência de ondas sonoras para o líquido (vibração); e o segundo consiste do colapso de bolhas formadas através da vibração do aparelho.

Os aparelhos ultra-sônicos convertem energia elétrica em energia mecânica numa frequência de ondas sonoras acima da taxa normal de audição (ABELSON, 1981). Estas vibrações induzem à rápida formação e colapso de bolhas microscópicas. A formação e o colapso das bolhas produzem uma alta energia que resulta em choques hidráulicos. Estes choques constituem-se na ação de fricção que destrói por erosão os resíduos da superfície de objetos submersos no líquido, contido no interior do aparelho. (ABERE, 1979; PARANHOS, 1996).

Higienizadores sônicos, em contraste com os de ultra-som, usam a energia vibratória, não ultra-sônica. Eles produzem ondas de energia eletro-sônica audíveis por meio de uma solução de limpeza específica. Higienizadores sônicos têm capacidade de limpeza similar a dos higienizadores do tipo imersão (MUENCHINGER, 1975). Segundo a ADA (1981 apud PALENIK; MILLER, 1984, p.751) os aparelhos ultra-sônicos podem promover uma ação de limpeza maior que os métodos de imersão e que os aparelhos sônicos.

Apesar do desenvolvimento de pesquisas com a utilização do ultra-som como agente mecânico para a higienização de próteses totais, sua eficácia ainda é contraditória. As opiniões se divergem com relação a sua eficiência, isto é, se ela é atribuída à atividade mecânica do aparelho ou à solução de imersão usada no interior do aparelho. A ADA (1974-1975 apud ABELSON, 1981, p.377) sugere que esses higienizadores realmente aumentam a capacidade de limpeza de uma solução detergente. Ela indica, porém, que a limpeza da dentadura está mais associada à atividade química das soluções que propriamente à atividade mecânica do aparelho.

Budtz-Jorgensen (1979) afirmou que o tratamento ultra-sônico em si não reduz significativamente o número de microrganismos cultiváveis nas dentaduras, mas concorda que, em conjunto com a solução desinfetante, ele aumenta a efetividade de desinfecção e não deteriora a superfície polida da prótese.

Muechinger (1975) comparando a efetividade de um agente eletro-sônico com um agente de imersão convencional à base de peróxido alcalino, encontrou que ambos os métodos foram ineficazes na remoção do biofilme e do cálculo, apesar de ter sido usada solução de limpeza específica para prótese total no aparelho ultra-sônico.

Contudo, alguns trabalhos relatam a superioridade do ultra-som em relação às soluções químicas para imersão.

Abelson (1981) comparou a habilidade de remoção do biofilme de um aparelho ultra-sônico quando utilizado somente com água ou com peróxido alcalino (Efferdent[®] ou Polident[®]). Os resultados mostraram superioridade do ultra-som quando usado com água em relação às duas soluções de imersão. A ação de limpeza foi relacionada apenas à cavitação sônica, e não propriamente às soluções químicas.

Gwinnett e Caputto (1983) também avaliaram o mesmo aparelho de ultra-som, porém usaram microscopia eletrônica de varredura. Foram confeccionadas 3 próteses superiores, sendo cada prótese dividida em 7 fragmentos, que foram colocados em recipiente contendo saliva de 6 voluntários, com a finalidade de precipitar a camada de proteína salivar e esta atuar como substrato para adesão e crescimento de microrganismo. Foi comparada a eficiência do aparelho ultra-sônico com a de soluções químicas para imersão (Efferdent[®] e Polident[®]). Os resultados mostram que o Polident[®] comportou-se similarmente ao Efferdent[®], permanecendo na superfície das próteses uma grande quantidade de microrganismos, por outro lado o ultra-som (Sonic Scrub[®]) deixou as superfícies limpas e livres de microrganismos.

Palenik e Miller (1984) compararam a eficiência de dois aparelhos ultra-sônicos com um produto de imersão (Efferdent[®]). As próteses foram contaminadas com *Streptococcus mutans* 6715 e incubadas por 18 a 24 horas para acúmulo de biofilme. Os aparelhos de ultra-som mostraram resultados melhores que o Efferdent[®], sendo que o Branson Cu-6[®] mostrou-se mais eficiente que o Sonic-Scrub[®], após 15 minutos de operação.

Raab et al. (1991) comparando a eficiência de dois métodos de limpeza, imersão em solução de peróxido alcalino (Efferdent®) e ultra-som (L&R Transister/Ultrasonic T-28®) na habilidade de remoção de depósitos superficiais (biofilme, cálculo e pigmentação por nicotina), empregaram metodologia de quantificação por meio de microscópio eletrônico de varredura. Foram preparadas 30 amostras provenientes de 10 próteses totais para o exame. Foram realizadas fotografias (80X e 5000x) das regiões representativas de cada amostra, e cada fotografia foi avaliada por 5 examinadores, totalizando 150 observações. As fotografias foram graduadas em uma escala de 1 (superfície limpa) a 10 (superfície totalmente contaminada de acordo com a percentagem da área recoberta por depósitos), e para cada observador, foi fornecida uma fotografia de uma superfície da prótese isenta de biofilme para fins comparativos. Os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os 3 tratamentos (controle, imersão e ultra-som) com superioridade do ultra-som. O ultra-som demonstrou ser um método de limpeza rápido, barato e simples para pacientes debilitados. Contudo os autores recomendam que sejam feitos outros trabalhos com maior número de amostras, para a comprovação da eficiência do ultra-som.

2.4.2 Agentes Químicos

A higienização de próteses por agentes químicos consiste na imersão do aparelho em soluções que tenham ação solvente, detergente, bactericida e fungicida. Os agentes químicos do tipo imersão podem ser divididos como hipocloritos alcalinos, ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos, desinfetantes (gluconato de clorexidina), enzimas e peróxidos alcalinos.

2.4.2.1 Hipoclorito alcalino

O hipoclorito alcalino é útil na remoção de manchas e causa o clareamento da resina acrílica, no entanto é altamente corrosivo e contra-indicado para próteses com componentes metálicos (ABELSON, 1981; SHAY, 2000; CARVALHO et al., 2003; SALLES, 2006). Segundo Harrison, Johnson e Douglas (2004) e Webb; Thomas; Whittle (2005), o hipoclorito alcalino reduz eficazmente o número de *Candida* da superfície de próteses totais. Contudo, seu gosto e odor desagradáveis não o tornam comercialmente aceitáveis para os pacientes, como os outros produtos. (PARANHOS, 1996).

2.4.3.2 Ácidos

Os ácidos são efetivos na remoção de manchas e de componentes inorgânicos dos depósitos. São altamente corrosivos, não sendo recomendados para a higienização de próteses que apresentam componentes metálicos (ABERE, 1979). Os ácidos requerem cuidados no manuseio, de modo a evitar acidentes como irritação na mucosa ou nos olhos. Por esta razão, os mesmos devem ser manuseados apenas pelo dentista (PARANHOS, 1996; SALLES, 2006).

2.4.2.3 Desinfetante (Digluconato de Clorexidina)

A ação antimicrobiana do digluconato de clorexidina é resultado de sua adsorção e absorção celular, a qual promove a perda de componentes intracelulares. Em baixas concentrações é bacteriostática e em altas concentrações, é bactericida (SALLES, 2006). Sua ação antimicrobiana atinge um amplo espectro de microrganismos, inclusive *Candida sp* (ELLEPOLA et al., 2001). A clorexidina

pode provocar manchas na prótese total, além de ter um gosto amargo (PARANHOS, 1996).

2.4.2.4 Enzimas

As enzimas demonstram bons resultados no que tange à remoção do biofilme, pois são capazes de quebrar mucoproteínas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos da matriz do biofilme (CONNOR et al, 1977; TAMAMOTO et al, 1985). As enzimas têm capacidade fungicida (NAKAMOTO; TAMAMOTO; HAMADA, 1991). No entanto, para sua total eficiência, é necessário um período de imersão prolongado e a realização de uma escovação subsequente. (BUDTZ-JORGENSEN, 1977).

2.4.2.5 Pastilhas efervescentes à base de peróxido alcalino

Os peróxidos são uma combinação de liberadores de oxigênio (agente ativo), como perborato ou percarbonato de sódio e um detergente alcalino, para reduzir a tensão superficial (Budtz-Jorgensen, 1979).

Os peróxidos não têm a alta acidez dos ácidos e nem a alcalinidade dos hipocloritos. Eles são uma combinação química complexa de ingredientes ativos designados para atacar primariamente os constituintes orgânicos dos depósitos nas próteses.

Sua ação é um pouco diferente dos hipocloritos. A quantidade de oxigênio disponível deveria determinar, em algum grau, a efetividade da solução higienizadora. Quando dissolvidos em água, tornam-se soluções alcalinas de peróxido de hidrogênio, que em contato com certas substâncias decompõe-se liberando pequenas bolhas de oxigênio que exercem ação mecânica de

desprendimento entre a superfície da prótese e o biofilme, além disso os agentes oxidantes ajudam a remover manchas e têm alguma ação bactericida.

Segundo Lhinde (1988) e Jyoti e Pandit (2003), o peróxido de hidrogênio pode atingir áreas vitais da célula e gerar radicais hidroxila (OH), que são altamente reativos.

Estudos comparativos entre peróxidos alcalinos e outros produtos de higienização de próteses mostram resultados variados.

Rustogi et al. (1979), por exemplo, compararam a efetividade de 4 produtos higienizadores de prótese total na remoção diária do acúmulo de biofilme em próteses de 15 pacientes. Os produtos testados foram do tipo efervescente, 2 produzindo dióxido de carbono: Efferdent® e Polident® (peróxidos alcalinos) e 2 produzindo oxigênio: Polident® em pó (peróxido alcalino) e Mersene® em grãos (hipoclorito alcalino). O Mersene® foi o mais eficaz, sendo que os tabletes de Polident® e Efferdent® mostraram-se significativamente menos eficientes, mesmo em imersão prolongada (9 horas).

Em contraposição, Dills et al. (1988) testaram a eficácia dos métodos de escovação e de imersão na redução do número de microrganismos em pacientes usuários de próteses totais. Dezesseis pacientes testaram a escovação com dentífrico específico Dentu-creme® e a imersão da prótese em peróxido alcalino Efferdent®. Primeiramente, cada método foi testado de forma individual e, posteriormente, ambos foram combinados. Previamente à higienização, o biofilme foi acumulado por um período de 72 horas. A colheita microbiológica foi realizada utilizando-se esfregaços obtidos da prótese e da mucosa adjacente. O método de imersão isolado reduziu a maior quantidade de microrganismos, com ação em largo espectro para *Fusobacteria sp*, *Streptococcus sp* e *Veillonella sp*. Os autores

concluíram que a escovação associada ao método de imersão é necessária para higienização adequada da prótese.

Moore, Smith e Kenny (1984) compararam a eficiência de 8 produtos na remoção e eliminação de microrganismos aeróbios, anaeróbios e leveduras. Os produtos testados foram os peróxidos alcalinos (Denalan[®], Efferdent[®]; Kleenite[®]; Mersene[®] e Polident[®]), os hipocloritos alcalinos (Clorox[®], Calgon[®]) e um produto de origem desconhecida (Miller's[®]). Os resultados mostraram que o Miller's[®] e Kleenite[®] foram os produtos mais efetivos. Em segundo lugar, veio a escovação com água e sabão, combinada com a imersão no agente Mersene[®]. Embora os hipocloritos alcalinos (Clorox[®] e Calgon[®]) tenham-se mostrado efetivos na eliminação de leveduras em condições laboratoriais, eles não foram efetivos clinicamente.

Chan et al. (1991) compararam a eficácia de higienização da solução Efferdent[®] com o método de escovação (dentifrício específico Dentu-Creme[®]) em um grupo de 18 pacientes, sendo as próteses higienizadas da seguinte forma: 1- escovação com o dentifrício específico, 2 - imersão em solução higienizadora e 3- imersão seguida de escovação. Cada método foi avaliado microbiologicamente por 4 semanas. Previamente aos testes, os indivíduos suspendiam a higienização por 48 horas. Para análise microbiológica, o material era coletado por esfregaço da superfície interna das próteses antes e após a higienização com o método testado. Constataram que o tratamento com Efferdent[®], no que tange à eliminação de microrganismos, atingiu melhores resultados que a escovação isolada.

Nakamoto, Tamamoto e Hamada (1991) com o propósito de avaliar a ação antimicrobiana relativa à espécie de leveduras *C. albicans*, estudaram quatro produtos higienizadores contendo enzimas proteolíticas (Pika[®], Liodent[®], Dr.Health[®], Polident[®]) e um produto à base de peróxido alcalino (Polident[®]). Foi testada a ação

lítica de levedura, a ação fungicida e a propriedade de remoção de *Candida*, sendo que o tempo total utilizado para cada produto foi de cento e vinte minutos. Como resultados, observaram que as enzimas conseguiram remover o biofilme, produzindo menor deterioração dos componentes da prótese. Os produtos com enzimas proteolíticas quando comparados entre si, mostraram baixa atividade lítica nas leveduras, como também não se constatou diferenças significativas entre os produtos comerciais com enzimas e com peróxido alcalino. No teste fungicida, apenas dois produtos comerciais compostos por enzimas proteolíticas e o produto com peróxido alcalino mostraram forte atividade fungicida. No que se refere à propriedade de remoção de *Candida*, os resultados não revelaram diferenças significativas entre os produtos, sendo que todos se mostraram efetivos. Após cento e vinte minutos, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os produtos nos testes de ação lítica e de ação fungicida.

Drake, Wells e Ettinger (1992) avaliaram os agentes Polident® e Efferdent® (peróxidos alcalinos) contra microrganismos clinicamente relevantes - *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. Os resultados demonstraram que ambos produtos foram capazes de reduzir substancialmente ou eliminar a colonização de *S. mutans*, porém houve apenas uma redução mínima de *Candida albicans*.

Mc Cabe, Murray e Kelly (1995) compararam a eficácia de remoção do biofilme, mancha e cálculo em próteses totais, dos seguintes métodos: imersão utilizando tabletes experimentais da Reckitt GmbH® (diluído em água à 35°C) e Steradent® (diluído em água à 50°C); escovação com dentífrico Colgate anti-tártaro® e com sabonete Cassons Imperial Leather®. Os métodos foram testados alternadamente durante quatro semanas. As próteses superiores de 46 pacientes foram inicialmente coradas e o biofilme quantificado pela atribuição de escores.

Posteriormente, cada prótese foi higienizada por um profissional com um dos métodos testados e a evidenciação e atribuição de escores novamente realizada. Os agentes de imersão foram utilizados conforme recomendação do fabricante e a escovação realizada durante dois minutos. A imersão em Steradent® foi a forma mais efetiva para remoção de biofilme e manchas. Não houve diferença quanto à capacidade de remoção de cálculo para ambos os produtos. O sabonete foi mais efetivo que o dentífrico na remoção de manchas.

Nikawa et al. (1995) avaliaram, *in vitro*, a eficácia de higienizadores de próteses na redução da atividade de *Candida albicans* no biofilme. Onze higienizadores de próteses (Steradent®, Doctor Health®, Dent Free®, Nisodent®, Polident®, Liodent®, Clean Soft®, Pika DCE®, Plakick®, Spa Dent®, emuCAE®) divididos em cinco grupos (peróxido alcalino; peróxido neutro com enzimas; enzimas; drogas naturais e desinfetante) foram testados. Para isto, espécimes colonizados por cepas padrão de *Candida albicans* foram imersos em 200ml de cada solução higienizadora. Após 24 e 30 hs de incubação, o pH do meio de cultura com cada espécime foi medido para avaliar a atividade residual de biofilme. Os resultados mostraram que com 2 horas de incubação, leveduras sobreviventes não foram detectadas em qualquer um dos higienizadores à base de peróxido e que o peróxido alcalino (Steradent®), o peróxido neutro com enzimas (Doctor Health®, Dent Free®, Nisodent®, Polident® e Liodent®), o desinfetante (emuCAE®) e o higienizador enzimático (Clean Soft®) reduziram a atividade do biofilme.

Kulak et al. (1997) investigaram as propriedades de limpeza (remoção de biofilme e cálculo) de vários agentes higienizadores de prótese totais, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Foram selecionados 5 pacientes, os quais tiveram as superfícies palatinas de suas próteses totais superiores seccionadas em

8 amostras de aproximadamente 1 cm². Tais amostras foram fotografadas (aumento 5000x) para posterior leitura em microscópio eletrônico de varredura. Das 8 amostras, 1 não foi incluída nos procedimentos de higiene. Uma amostra recém-processada isenta de biofilme foi fotografada e utilizada como controle. As amostras foram imersas durante o período noturno em soluções higienizadoras (Corega[®], Dentipur[®], Fittydent[®], hipoclorito de sódio, Savlon[®] e Ipanol[®]) e escovadas por trinta segundos (escova de cerdas macias e pasta para dentaduras Ipana[®]). As fotografias de cada amostra foram graduadas por 3 examinadores em uma escala de 1 a 5, de acordo com a percentagem de área recoberta pelos depósitos. Os resultados mostraram que a imersão em hipoclorito de sódio promoveu remoção significativa dos depósitos de biofilme.

Gornitsky et al. (2002) avaliaram 27 pacientes hospitalizados, com objetivo de verificar a eficácia de 3 higienizadores de dentadura (Denture Brite[®], Polident Overnight[®] e Efferdent[®]) frente à propriedade de remoção de restos alimentares, biofilme e pigmentações. O período experimental foi de 35 dias, com 21 dias de uso dos produtos e 14 dias de enxágüe com água. Para avaliação dos níveis de biofilme foram realizadas fotografias das próteses, por técnico especializado, antes e após o tratamento. As fotografias foram avaliadas por 3 examinadores e os níveis de depósitos (restos alimentares, biofilme e pigmentações) foram avaliados em uma escala gráfica de 0 a 100mm, por meio do traçado de uma linha demarcatória. Quanto maior a distância entre as linhas demarcadas antes e após o uso dos produtos, menor a eficácia do tratamento. Os resultados mostraram eficácia similar entre os produtos testados, entretanto a comparação com o grupo controle (água) indicou redução significativa dos níveis de depósitos.

Pavarina et al (2003) avaliaram a efetividade de soluções de imersão na redução do crescimento microbiano em 64 próteses totais. Inicialmente, as próteses foram escovadas por 1 minuto com clorexidina a 4%, para que o material orgânico pesado fosse removido. As próteses foram divididas em 4 grupos: 1- gluconato de clorexidina a 4%; 2- hipoclorito de sódio a 1%; 3- solução de Biocide[®] (iodóforos) e 4- solução de Amosan[®] a 3,78% (peróxido alcalino). As soluções desinfetantes foram testadas com e sem o uso de ultra-som. Os resultados mostraram que gluconato de clorexidina a 4%, hipoclorito de sódio a 1% e solução de Amosan[®] a 3,78% (peróxido alcalino) reduziram o crescimento de microrganismos após os 10 minutos de imersão; já o Biocide[®] não foi tão efetivo quanto as outras soluções. O uso do ultra-som não mostrou melhora evidente na efetividade das soluções de imersão avaliadas. O autor acredita que a escovação com clorexidina a 4%, no início do experimento, possa ter proporcionado este resultado.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Considerando as dificuldades de higienização da prótese total, em razão de suas características anatômicas, bem como das microporosidades inerentes às resinas acrílicas e da redução das habilidades manuais do paciente em decorrência da idade, esta pesquisa foi proposta com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana de um agente químico - pastilha efervescente; e de um agente físico - a cuba de ultra-som, frente aos estreptococos do grupo mutans, visto que estas bactérias são responsáveis pela consolidação e progressão do biofilme dental e protético, e frente às leveduras do gênero *Candida*, uma vez que têm sido constantemente relacionadas ao uso de prótese total e à falta de higienização desta.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar diferentes tratamentos de higienização de próteses totais, em relação a sua ação antimicrobiana frente às leveduras do gênero *Candida* e aos estreptococos do grupo mutans, a saber:

- a. utilização de pastilha efervescente, uma vez ao dia, durante 5 minutos, por 21 dias.
- b. utilização de ultra-som por 15 minutos, após 21 dias de formação do biofilme.
- c. utilização de ultra-som por 15 minutos, após 21 dias de utilização de pastilha efervescente, uma vez ao dia, durante 5 minutos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção de pacientes

Este projeto envolveu 113 usuários de próteses totais superiores, que foram atendidos pela Clínica de Prótese Total do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, em 2006 e 2007, e que concordaram em participar desta pesquisa.

Os critérios de exclusão da presente pesquisa abrangeram pacientes:

- a) que tinham feito uso de antibiótico nos 3 meses anteriores à colheita;
- b) que eram imunodeprimidos; e
- c) que eram diabéticos

A exclusão de pacientes portadores de diabetes e de imunodepressão ocorreu devido ao fato de que, estas doenças sistêmicas tornam a cavidade oral destes pacientes mais suscetíveis a infecções, principalmente por leveduras do gênero *Candida*, e isto poderia interferir nos resultados, uma vez que esta pesquisa visa detectar e controlar estes microrganismos, decorrentes justamente da utilização de próteses totais.

Os 113 pacientes acima mencionados foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, a saber:

GRUPO 1 - Este grupo foi utilizado como controle.

Realizou escovação 3 vezes ao dia, deixando a prótese imersa em água filtrada, durante à noite, por 21 dias.

Participaram deste grupo 25 pacientes.

GRUPO 2 - Este grupo realizou escovação 3 vezes ao dia, e utilizou 1 pastilha efervescente (Corega Tabs[®] - Block Drug Company, Inc. - USA), 1 vez ao dia, por 5 minutos, antes de dormir, e deixou a prótese imersa em água filtrada, durante à noite, por 21 dias. Participaram deste grupo 29 pacientes.

GRUPO 3 - Este grupo realizou escovação 3 vezes ao dia, e deixou a prótese imersa em água filtrada, durante à noite, por 21 dias, após o que, a prótese foi submetida ao ultra-som (Ultrasonic Cleaner[®] - Odontobrás - modelo 2840D - Ind. E Com. Equip. Méd. Odont. Ltda - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) durante 15 minutos. Participaram deste grupo 28 pacientes.

GRUPO 4 - Este grupo realizou escovação 3 vezes ao dia, e utilizou 1 pastilha efervescente (Corega Tabs[®] - Block Drug Company, Inc. - USA),1 vez ao dia, por 5 minutos, antes de dormir, e deixou a prótese imersa em água filtrada, durante à noite, por 21 dias, após o que, a prótese era submetida ao ultra-som (Ultrasonic Cleaner[®] - Odontobrás - modelo 2840D - Ind. E Com. Equip. Méd. Odont. Ltda - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) durante 15 minutos. Participaram deste grupo 31 pacientes.

Cumpre esclarecer que todos os grupos realizaram a escovação por meio de técnica de escovação padronizada, que era ensinada aos pacientes na 1ª visita; além disso, a escova para prótese dental de cerdas macias (Bitufo[®], Valinhos, São

Paulo, Brasil) era fornecida para todos os integrantes dos 4 grupos (figura 1). As pastilhas efervescentes (Corega Tabs® - Block Drug Company, Inc. - USA) eram fornecidas para os pacientes dos grupos 2 e 4 (figura 2). As próteses dos grupos 3 e 4 eram submetidas ao ultra-som (Ultrasonic Cleaner® - Odontobrás - modelo 2840D - Ind. E Com. Equip. Méd. Odont. Ltda - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 15 minutos, após 21 dias da remoção profissional do biofilme e imediatamente antes da 2ª colheita (figuras 3).

Figura 1- Escova de cerdas macias para higienização das próteses totais. (Bitufo®, Valinhos, São Paulo, Brasil)

Figura 2. pastilhas efervescentes (Corega Tabs®, Block Drug Company, Inc. - USA)

Figura 3. Ultra-som (Ultrasonic Cleaner® - Odontobrás - modelo 2840D - Ind. E Com. Equip. Méd. Odont. Ltda - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil)

O tratamento das próteses realizado por ultra-som (Ultrasonic Cleaner® - Odontobrás - modelo 2840D - Ind. E Com. Equip. Méd. Odont. Ltda - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) foi utilizado para verificar a eficiência de sua ação antimicrobiana, em relação ao biofilme das próteses, com objetivo de validar este tratamento como uma alternativa para a manutenção das próteses daqueles pacientes que, por algum motivo, apresentem dificuldade de higienização de suas próteses; e para os dentistas e protéticos, para evitar contaminação cruzada no consultório e no laboratório, respectivamente.

Para tanto, todos os béquers utilizados no ultra-som foram previamente autoclavados e após a colocação de água esterilizada e de uma prótese em cada um dos béquers, estes foram vedados com filme PVC, de modo a evitar a contaminação cruzada. (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Béquers, contendo água esterilizada e uma prótese, vedados com filme PVC

Figura 5. Béquers no ultra-som (Ultrasonic Cleaner® - Odontobrás - modelo 2840D - Ind. E Com. Equip. Méd. Odont. Ltda - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil),

Foram realizadas 2 colheitas de amostras de biofilme de todos os pacientes. A primeira - "baseline"- era executada antes da utilização de qualquer um dos procedimentos descritos acima para cada um dos grupos. Em seguida, as

próteses recebiam profilaxia profissional, isto é, eram coradas e escovadas até a remoção total do biofilme corado, com a finalidade de zerar o biofilme da prótese antes do início dos tratamentos de higienização. Para este procedimento, foram utilizadas escovas de cerdas macias (Denture® - Condor S.A., Santa Catarina, Brasil - figura 19) e sabonete líquido (JOB Química, Produtos para limpeza Ltda., Monte Alto, SP, Brasil). A segunda colheita ocorria 21 dias após o início da realização dos procedimentos de higiene das próteses.

4.2 Evidenciação do Biofilme

A prótese era removida da boca pelo próprio paciente, que a colocava em uma placa de Petri vazia e esterilizada. Para o procedimento de evidenciação do biofilme, as próteses foram enxaguadas com água destilada esterilizada (figura 6) e secas com jato de ar da seringa tríplice, por 10 segundos (figura 7). Em seguida, o biofilme da superfície interna das próteses foi evidenciado com solução corante vermelho neutro a 1%, que foi aplicada com o auxílio de um cotonete esterilizado (figuras 8 A e 8B).

Figura 6. Prótese sendo enxaguada com água destilada esterilizada

Figura 7. Aplicação de jato de ar

Figuras 8A e 8B. Evidenciação do biofilme com solução vermelho neutro 1%.

As próteses foram novamente enxaguadas com água destilada esterilizada, por 5 segundos, para a remoção do excesso de evidenciador (figura 5) e, posteriormente, foram secas com jato de ar, por 10 segundos. (figura 6).

Figura 5. Prótese sendo enxaguada com água destilada esterilizada

Figura 6. Aplicação de jato de ar

4.3 Colheita e Semeadura das Amostras

A colheita era realizada assepticamente. Cada prótese era segurada com auxílio de uma pinça esterilizada, sobre uma placa de Petri esterilizada, onde era simultaneamente escovada e enxaguada com 10,0 ml de solução salina tamponada fosfatada esterilizada (PBS) (figuras 7 e 8).

Figura 7. Colocação da solução salina

Figura 8. Escovação da prótese em ambiente asséptico

A escovação foi realizada pelo mesmo profissional, procurando atuar sempre com a mesma frequência de movimentos e durante um intervalo de tempo regular (cinco minutos) em condições assépticas. As escovas utilizadas eram de cerdas macias (Denture[®] - Condor S.A., Santa Catarina, Brasil - figura 19). A suspensão resultante foi então transferida, com auxílio de uma pipeta esterilizada (figura 9) para um tubo de ensaio esterilizado (figura 10)

Figura 9. Pipetagem da solução resultante

Figura 10. Transferência da solução resultante para o tubo de ensaio.

Os tubos contendo as amostras do material colhido das próteses (figura 11) eram levados imediatamente para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, onde eram imediatamente processados.

Figura 11. Amostras colhidas

Após homogeneização em agitador mecânico (Phoenix[®] - AP56 - Ind. e Com. de Equip. Científicos Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil) em velocidade máxima por 2 minutos (figura 12), as amostras eram submetidas à diluição decimal seriada em salina tamponada fosfatada (PBS) até 10^{-5} (figura 13). Para tanto, alíquota de 500,0 μ L da amostra (figura 14A) era transferida para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de PBS (salina tamponada fosfatada) (figura 14B) e, após homogeneização desta diluição, uma alíquota de 500,0 μ L da mencionada diluição era transferida para o tubo subsequente, e assim, sucessivamente até que a diluição 10^{-5} fosse atingida.

Figura 12. Homogeneização das amostras em agitador mecânico

Figura 13. Diluição decimal seriada até 10^{-5} , em tubos contendo 4,5 mL de salina fosfatada tamponada (PBS).

Figura 14 – Transferência de 500,0µL da amostra (A) para o tubo contendo 4,5 mL de PBS (B).

Alíquotas de 50,0µL de cada uma das diluições (figura 15) eram semeadas em placas (10x60mm) contendo Chromagar[®] Candida (CHROMagar Microbiology, Paris, France), Ágar Sacarose-Bacitracina (SB20) (DAVEY; ROGERS, 1984) e em Brain Heart Infusion Agar (Difco[®]) (figura 16), que eram incubadas a 37°C, em aerobiose, por 48 horas; a 37°C, em microaerofilia, por 48 a 72 horas e a 37°C, em aerobiose, por 24 horas, respectivamente (figuras 17 e 18).

Cumpra ressaltar que todos os procedimentos foram realizados assepticamente em câmara de fluxo laminar (VECCO®, Campinas, Brasil).

Figura 15. Transferência de 50,0µL de cada diluição para as respectivas placas contendo os meios de cultura

Figura 16. Semeadura das amostras

Figura 17. Placas contendo meio SB20 sendo incubadas em microaerofilia.

Figura 18. Incubação em estufa bacteriológica (FANEN LTDA, São Paulo, Brasil) à 37°C.

4.4 Contagem/Identificação das Colônias de estreptococos do grupo mutans.

Decorrido o período de incubação, as colônias características de estreptococos do grupo mutans (FIGURA 19) eram contadas, com auxílio de microscópio estereoscópico (LEICA® - S-6E, Heerbrug, Suíça), sempre pelo mesmo pesquisador. A identificação perfunctória era realizada pela observação das

características morfológicas das colônias, de acordo com Davey e Rogers (1984) e Azevedo (1988), como a seguir:

- Colônias cor branca ou creme-amareladas, superfície granular semelhante a vidro moído, com aspecto fragmentado a partir do centro, podendo apresentar no topo gotícula de polissacarídeo extracelular. Essas colônias são geralmente duras, esmigalhando-se quando tocadas com agulha de platina (*Streptococcus mutans*).
- Colônias firmes, opacas, que não se desintegram quando tocadas com agulha de platina, podendo portanto ser deslocadas facilmente. Apresentam, com frequência, no topo, gotícula cintilante de polissacáride. São circundadas por um halo branco leitoso, visível a olho nu (*Streptococcus sobrinus*.)

Figura 19. Estreptococos do grupo mutans

O número de colônias isoladas de estreptococos do grupo mutans era anotado para cada uma das diluições (10^0 a 10^{-5}), em ficha própria, para posterior cálculo do número de unidades formadoras de colônia (ufc) por mililitro de amostra. Dentre os estreptococos do grupo mutans foram quantificados aqueles, cujas características eram de *S. mutans* ou de *S. sobrinus*, uma vez que é sabido que

estas são as duas subespécies de estreptococos do grupo mutans, geralmente detectadas na cavidade oral de seres humanos.

4.5 Contagem/Identificação do número de leveduras do gênero *Candida*

Decorrido o período de incubação, as colônias características de leveduras do gênero *Candida* (figura 20) eram contadas, com auxílio de microscópio estereoscópico (LEICA® - S-6E, Heerbrug, Suíça), sempre pelo mesmo pesquisador.

Figura 20. Leveduras do gênero *Candida*

O meio de cultura CHROMagar® *Candida* (Microbiology, Paris, France) é um meio cromogênico, seletivo-diferencial, para leveduras, e segundo Odds e Bernaerdt (1994) é utilizado para diferenciar presuntivamente *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Assim, as colônias de *Candida albicans*, após 48 horas de incubação a 37°C, adquirem coloração verde-claro bem característico, enquanto que as colônias de *Candida dubliniensis* apresentam cor verde-escuro, as de *Candida krusei*, cor rosa e as de *Candida tropicalis*, cor azul ou roxa. Assim, o

número relativo de colônias de cada uma das espécies perfunctoriamente identificadas pela cor, no CHROMagar[®] Candida, era anotado para cada uma das diluições (10^0 a 10^{-5}), em ficha própria, para posterior cálculo do número de leveduras do gênero *Candida* presentes por mililitro de amostra. Cada uma das diferentes espécies identificadas perfunctoriamente era semeada em Ágar Sabourand-Cloranfenicol (Difco[®]) (figuras 21 e 22), que eram incubadas a 37°C, por 24 horas, para posterior confirmação das espécies.

Figura 21. Leveduras do gênero *Candida*

Figura 22. Transferência da levedura para o Ágar Sabouraud-Cloranfenicol.

4.6 Cálculo do número de unidades formadoras de colônias de estreptococos do grupo mutans e de leveduras do gênero *Candida* (por ml de amostra)

O cálculo do número de unidades formadoras de colônias de estreptococos do grupo mutans (n° de ufc/ml) e de leveduras do gênero *Candida* era realizado da seguinte forma:

O número de colônias de estreptococos do grupo mutans e de leveduras do gênero *Candida*, correspondente a cada uma das diluições, era multiplicado pelo número 20 e pelo respectivo fator de diluição. O número de ufc, assim obtido, para

cada uma das diluições de uma mesma amostra, era somado e, em seguida, dividido pelo número de placas contáveis ($1 \geq 300$).

4.7 Meios de Cultura e Eluentes

SALINA FOSFATADA TAMPONADA – PBS

Aplicação: Utilizado como eluente para a diluição decimal seriada.

Solução A

Fosfato de potássio monobásico (Merck).....4,54g

Água destilada.....500,0mL

Solução B

Fosfato dissódico (Merck).....7,34g

Água destilada.....775,0mL

Cloreto de sódio (Merck).....10,63g

Após preparadas, as soluções A e B eram misturadas e acrescidas de cloreto de sódio, em quantidade suficiente, isto é, 10,63g do sal para o volume (1.275,0mL) da solução tampão. Depois eram distribuídas em tubos (15x125mm) em alíquotas de 4,5mL, que eram autoclavados a 120°C durante 20 minutos.

AGAR SACAROSE-BACITRACINA – SB20 (Davey e Rogers; 1984 modificado por Azevedo; comunicação pessoal)

Aplicação: Utilizado para a identificação e contagem de estreptococos do grupo mutans.

Casitone (Difco).....15,0g

Extrato de levedura (Difco)..... 5,0g

L-cisteína (Merck).....	0,2g
Sulfito de sódio (Merck).....	0,1g
Acetado de sódio (Merck).....	20,0g
Sacarose (açúcar cristal).....	200,0g
Agar (Difco).....	15,0g
Água destilada q.s.p.....	1.000,0mL

OBS: A modificação introduzida por Azevedo foi a substituição da sacarose P.A. pelo açúcar cristal.

Aos componentes, depois de pesados, era adicionada água destilada. O meio era autoclavado a 120°C, durante 20 minutos e, logo em seguida, era retirado da autoclave, para evitar a caramelização da sacarose. Após o resfriamento, a aproximadamente 50°C, era adicionada 1,0% de uma solução de bacitracina (BYK) a 0,2UI/mL. Alíquotas de 5,0mL do meio eram distribuídas, assepticamente, em placas de Petri (60x15mm) esterilizadas.

SABOURAUD DEXTROSE AGAR (DIFCO®)

Aplicação: Utilizado para manutenção de leveduras.

Neopeptona.....	10.0g
Dextrose.....	40,0g
Agar.....	15,0g

Eram rehidratados 65,0g do pó em um litro de água destilada e adicionados 50,0 mg% de cloranfenicol diluído em 2 a 3 gotas de álcool. Após a distribuição do meio em tubos (16x160mm), estes eram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, ref: CA220)

Aplicação: Utilizado para a identificação e contagem do número de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

Ágar.....	15,0g
Peptona.....	10,2g
Chromogenic mix.....	22,0g
Cloranfenicol.....	0,5g
Água destilada.....	1.000,0m

Eram dissolvidos 47,7g do meio em 1.000,0 mL de água destilada e aquecido até a sua total dissolução, com freqüente agitação. O meio era distribuído em placas de Petri (60x15mm) esterilizadas.

BRAIN HEART INFUSION ÁGAR (DIFCO®)

Aplicação: Utilizado para a contagem de aeróbios totais.

Infusão de cérebro bovino.....	200,0g
Infusão de coração bovino.....	250,0g
Protease Peptone (Difco).....	10,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Bacto-Dextrose.....	2,0g
Fosfato Dissódico.....	2,5g
Bacto-Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1.000,0mL

Eram rehidratados 52,0g do meio em 1.000,0 mL de água destilada e esterilizado em autoclave a 120°C, por 20 minutos. Alíquotas de 5,0 mL eram distribuídas em placas de Petri (60x15mm) esterilizadas.

4.8 Identificação de Leveduras

Depois de confirmada a pureza da colônia, foi realizada a identificação de acordo com a metodologia clássica (LACAZ et al, 2002) por meio das seguintes provas: temperatura de crescimento a 45°C; estudo da micromorfologia em ágar fubá acrescido de Tween-80; hidrólise da uréia; fermentação de carboidratos; assimilação de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio; produção de ascósporos; e redução do cloreto de trifeniltetrazólio. Todas as provas foram realizadas em câmara de fluxo laminar (VECCO®, Campinas, Brasil).

4.8.1 Crescimento a 45°C:

C. dubliniensis tem alto grau de similaridade com *C. albicans*. O crescimento em ágar sabouraud dextrose a 45°C tem sido o primeiro passo na diferenciação das duas espécies. O crescimento de *C. dubliniensis* é inibido a 45°C, enquanto *C. albicans* cresce eficientemente. A análise do crescimento a 45°C para a confirmação da espécie foi realizada para as amostras de leveduras que apresentaram coloração verde em CHROMagar® e clamidósporos em ágar fubá. Desta forma, alíquotas de 5 µL de suspensão da levedura em solução fisiológica a 0,85%, com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland, foram depositadas em placas de ágar sabouraud dextrose. Cada placa contendo 10 inóculos foi incubada a 37°C e 45°C por 48 horas.

4.8.2 Estudo da micromorfologia (microcultivo em lâmina):

Primeiramente foi montado um “Kit” contendo um suporte de vidro em “U” e uma lâmina de vidro dentro de uma placa de vidro forrada com papel de filtro. Os “Kits” foram devidamente esterilizados em autoclave. O meio ágar fubá acrescido de

tween-80 foi fundido e após seu resfriamento à aproximadamente 50°C, um volume correspondente a 3,0ml do meio foi depositado sobre a lâmina contida na placa de microcultivo até que uma camada espessa de meio sobre a lâmina fosse obtida. Após a solidificação, o microrganismo foi inoculado por três estrias paralelas na superfície do meio com o auxílio de uma alça em “L”. Em seguida, o inóculo foi coberto com uma lamínula esterilizada de modo que parte das estrias ficasse fora da lamínula, o papel de filtro foi umedecido com água esterilizada e o conjunto foi incubado a 30°C durante 72-96 horas. Após esse período a lâmina foi examinada ao microscópio em objetiva 40x, com o intuito de se observar as seguintes estruturas: blastoconídeos, artroconídeos, pseudomicélio, micélio e clamidósporos. É importante ressaltar que todos esses procedimentos para o microcultivo em lâmina foram realizados em câmara de fluxo laminar (VECCO®, Campinas, Brasil).

4.8.3 Prova da urease:

Os cultivos de levedura foram semeados, com auxílio de uma agulha de platina flambada, sobre a superfície do meio ágar uréia de Christensen inclinado em um tubo de ensaio. Após a semeadura, os tubos foram incubados a 37°C durante 24 a 120 horas. A produção de urease foi constatada pela viragem da cor do indicador vermelho de fenol, de amarelo para rosa, devido a alcalinização do meio de cultura.

4.8.4 Fermentação de carboidratos (zimograma)

Foram avaliadas a fermentação da glicose, maltose, sacarose e lactose. As leveduras foram semeadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido, com o respectivo carboidrato e um tubo de Durham em posição invertida para a captação de gás. Os tubos foram incubados a 37°C. As leituras foram realizadas

diariamente, até 30 dias de incubação. O resultado foi considerado positivo quando houve a formação de bolhas de gás dentro do tubo de Durhan.

4.8.5 Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio (auxanograma):

Foram preparados 5ml de suspensão de leveduras (cultura de 24 horas) em tubo de ensaio com água destilada esterilizada e 50 μ l extrato de levedura a 10%, com turvação correspondente ao padrão 2 da escala de McFarland. A seguir, aproximadamente 1,5ml da suspensão foi transferido para tubo de ensaio contendo 18,0ml de meio isento de fontes de carbono (meio C), previamente fundido e mantido a aproximadamente 50°C. Em seguida, após homogeneização, o meio foi vertido em placa de petri esterilizada e após a solidificação, alíquotas de aproximadamente 20mg de diferentes carboidratos foram depositadas em pontos eqüidistantes da referência previamente marcada na parte externa da base das placas. Foram utilizados os seguintes carboidratos para leveduras que apresentavam pseudo-hifas e /ou hifas: glicose, maltose, sacarose, lactose, celobiose, rafinose, ramnose, trealose e melibiose. E foram utilizados os seguintes carboidratos para leveduras que não apresentavam pseudo-hifas: glicose, lactose, sacarose, rafnose, celobiose, inositol, dulcitol, metanol e xilose.

Para assimilação de fontes de nitrogênio, 1ml da suspensão foi transferida para tubo de ensaio contendo 15,0ml do meio N (isento de fontes de nitrogênio), previamente fundido e esfriado a aproximadamente 50°C. Após distribuição e solidificação, alíquotas de cerca de 20mg das substâncias nitrogenadas (peptona e nitrato de potássio) foram depositadas em pontos equidistantes da referência previamente marcada na parte externa da base da placa.

As provas de assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio foram consideradas positivas quando houve formação de um halo de crescimento ao redor do ponto de aplicação do carboidrato ou da fonte de nitrogênio; e negativas, na ausência desse halo após 48-72 horas de incubação a 30°C.

4.8.6 Produção de ascoporos

As leveduras, com morfologias sugestivas de ascomiceto em microcultivo, foram semeadas em meio de acetato de Kleyn e incubadas a 25°C. Decorrido o período de uma semana, os ascoporos foram pesquisados microscopicamente em preparações coradas. Para a realização da coloração dos ascos, os esfregaços foram fixados a quente e corados com solução de fucsina concentrada (Ziehl Neelsen) durante 4 minutos. Em seguida, foram descorados com etanol a 95% + 1% de HCL concentrado, e posteriormente lavados com água. Após este procedimento, foram corados com solução azul de metileno a 1% durante 90 segundos, e lavados novamente com água. Os ascoporos foram visualizados em vermelho e os blastoconídios em azul em microscopia óptica (400x).

4.8.7 Redução do trifeniltetrazólio

Os inóculos foram semeados em estrias na superfície do ágar TTC e após incubação a 37°C durante 48-72 horas, foi observada a coloração das colônias. *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* reduzem o cloreto de trifeniltetrazólio formando formazana que produz coloração vermelho-tijolo para estas espécies de *Candida*.

4.8.8 Meios de cultura para a identificação de *Candida*

Agar Sabouraud (LACAZ, 1991)

Composição

Dextrose.....	20,0g
Peptona.....	10,0g
Agar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0g

Preparação:

A peptona e o ágar foram suspensos em água destilada. Após a fusão do ágar, foi acrescentada a dextrose e o meio foi distribuído em tubos e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização, os tubos foram solidificados em posição inclinada.

Agar fubá (LACAZ, 1991)

Composição

Fubá.....	40,0g
Agar.....	20,0g
Tween 80.....	10,0mL
Água.....	1000,0mL

Preparação:

O fubá foi suspenso em água de torneira e aquecido em banho-maria a 60°C, durante 1 hora. A seguir a suspensão foi filtrada com o auxílio de gaze dobrada, e o volume completado até 1000,0 mL. Em seguida, foi adicionado o agar, e o meio foi aquecido até a completa dissolução dos componentes. A

seguir foi adicionado o *Tween* 80 e, após a homogeneização, o meio foi distribuído em tubos, e esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após a solidificação os tubos foram mantidos em geladeira.

Agar uréia de Christensen (LACAZ, 1991)

Composição

Peptona.....	1,0g
Dextrose.....	1,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Fosfato de potássio monobásico.....	2,0g
Vermelho de fenol.....	0,012g
Agar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0mL

Preparação:

Os componentes, com exceção da uréia, foram colocados em balão, acrescidos de água destilada, e o meio foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento do meio a aproximadamente 50°C, uréia foi adicionada, e este foi assepticamente homogeneizado e distribuído em tubos esterilizados, que foram colocados em posição inclinada para solidificação do meio.

Meio para fermentação dos carboidratos (LACAZ, 1991)

Composição

Peptona.....	2,5g
Extrato de levedura.....	2,5g

Carboidrato.....	3,0g
Água destilada.....	100,0mL

Preparação:

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. A seguir, foi adicionado um dos seguintes carboidratos: dextrose, lactose, maltose, sacarose (em quantidades suficientes para concentrações finais de 3%). O meio foi distribuído em quantidades aproximadas de 3,5mL em tubos de Durhan em posição invertida.

Os tampões dos tubos de ensaio foram codificados com corante para diferenciar os substratos. A seguir o meio foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Para evitar hidrólise ou caramelização dos açúcares, a válvula da autoclave foi aberta rapidamente e os tubos foram retirados e esfriados em banho de gelo.

Meio para assimilação de fontes de carbono (Meio C-LACAZ, 1991)

Composição

Sulfato de amônio.....	5,0g
Fosfato de potássio monobásico.....	1,0g
Sulfato de magnésio heptaidratado.....	0,5g
Ágar.....	20,0g
Água destilada.....	1000,0mL

Preparação:

Os componentes foram suspensos em água destilada, sob agitação, e aquecidos até fusão do ágar. Foram distribuídos 18,0mL do meio em cada tubo,

e em seguida esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos, e conservados em geladeira.

Meio para assimilação de fontes de nitrogênio (Meio N-LACAZ, 1991)

Composição

Dextrose.....	20,0g
Fosfato de potássio monobásico.....	1,0g
Sulfato de magnésio heptaidratado.....	0,5g
Ágar.....	20,0g
Água destilada.....	1000,0mL

Preparação:

Os componentes, menos a dextrose, foram misturados em água destilada, e a suspensão aquecida até a fusão do ágar. Em seguida, foi acrescentada a dextrose, e volumes de 18,0mL do meio foram distribuídos em cada tubo. Todos foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos e conservados em geladeira.

Meio de acetato de Kleyn (LACAZ, 1991)

Composição

Bacto triptose.....	2,5g
Dextrose.....	0,62g
Cloreto de sódio.....	0,62g
Acetato de sódio triidratado.....	5,0g
Agar.....	20,0g
Água destilada.....	1000,0mL

Preparação:

Os componentes foram suspensos em água destilada, sob agitação, e aquecidos até a fusão do ágar. O meio foi distribuído em tubos, e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Os tubos foram colocados em posição inclinada para solidificação do meio e mantidos em geladeira.

Meio de Pagano-Levin (TTC-LACAZ, 1991)**Composição**

Peptona	10,0g
Extrato de levedura.....	1,0g
Dextrose.....	40,0g
Agar.....	20,0g
Água destilada.....	1000,0mL

Preparação:

Os componentes foram colocados em balão e adicionados de água destilada e em seguida autoclavados a 120°C, durante 20 minutos. O meio foi resfriado a aproximadamente 50°C e a seguir foram adicionados 100,0mg de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. Após a homogeneização o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas e conservado em geladeira.

4.9 Forma de análise dos resultados

4.9.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes tratamentos empregados para a higienização das próteses totais superiores

A avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes tratamentos foi realizada considerando a remoção profissional do biofilme da prótese como biofilme zero (inicial), e a contagem do número de ufc/ml dos microrganismos pesquisados, obtidos após 21 dias de realização dos diferentes tratamentos de higienização, foi considerada como contagem final. Quanto menor era este número final, maior era considerada a ação antimicrobiana dos tratamentos testados.

4.9.2 Análise Estatística

A comparação da eficiência dos tratamentos de higienização de prótese testados era feita comparando-se o número de ufc/ml obtidos de cada um dos microrganismos testados após a execução dos diferentes tratamentos de higienização, durante 21 dias com o número de ufc/ml obtido pelo grupo controle.

Os quatro tratamentos foram comparados por microrganismo, por meio do teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA, seguido pelo teste de Dunn ou HSD de Tukey, respectivamente, para comparações múltiplas. O teste empregado dependeu da aderência ou não à distribuição normal, sendo que para todas as espécies testadas houve homogeneidade de variâncias (teste de Levene, $P > 0,05$). O programa SPSS 12.0.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, Ill, EUA) foi utilizado para as análises. A significância estatística foi ajustada para $\alpha = 0,05$.

5. RESULTADOS

Como mostra a tabela 1, dos 25 pacientes que fizeram parte do grupo controle, 3 (amostras 3, 12 e 13) tiveram que ser excluídos, posto que suas próteses não apresentaram leveduras do gênero *Candida*, quando da 1ª colheita. Neste momento é importante lembrar de que a 1ª colheita não foi realizada com o objetivo de comparar o número de microrganismos quantificados com os da 2ª colheita, mas sim, para servir de parâmetro para a exclusão de pacientes que não apresentassem os microrganismos pesquisados, uma vez que se estes já não existiam inicialmente, seria falso considerar a ação antimicrobiana de algum procedimento de higienização à sua não detecção, quando da 2ª colheita. A ação antimicrobiana foi evidenciada pela não detecção ou pela detecção de um pequeno número dos microrganismos pesquisados, após profilaxia das próteses e realização do procedimento de higienização por 21 dias, ou seja, quando da 2ª colheita. Dos pacientes que participaram da 1ª colheita, 1 (amostra 14) não compareceu para a 2ª colheita, sendo portanto excluído.

Tabela 1 - Nível de contaminação de prótese totais superiores, por leveduras do gênero *Candida*, durante a 1ª e a 2ª colheitas - grupo controle

Amostras 1ª colheita	<i>C.albicans</i>		<i>C.krusei</i>		<i>C.tropicalis</i>		Outras Candidas		Amostras 2ª colheita
	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	
1	5,2x10 ⁴	5,3x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	25
2	5,4.x0 ³	6,0x10 ³	0	0	0	0	0	0	23
3	0	0	0	0	0	0	0	0	31
4	2,0x10 ⁵	2,1x10 ⁵	0	0	4,4x10 ³	7,2x10 ²	0	0	26
5	2,0x10 ⁵	7,7x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	29
6	1,7x10 ⁷	3,1x10 ⁶	0	0	6,4x10 ⁴	0	0	0	36
7	4,6x10 ⁷	9,4x10 ⁶	0	0	2,6x10 ⁵	7,6x10 ⁵	0	0	21
8	2,1x10 ⁵	2,4x10 ⁶	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 1,2x10 ⁷	<i>C.glabrata</i> 2,0x10 ⁸	32
9	8,6x10 ⁶	5,3x10 ⁵	0	0	4,0x10 ⁵	0	0	<i>C.parapsilosis</i> 3,2x10 ⁵	27
10	4,5x10 ³	1,4x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	28
11	8,9x10 ⁴	5,2x10 ⁷	8,8x10 ⁴	0	2,3x10 ⁴	5,4x10 ⁷	<i>C.glabrata</i> 1,1x10 ⁵	<i>C.parapsilosis</i> >6,0x10 ⁸	24
12	0	2,4x10 ²	0	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 1,1x10 ⁴	22
13	0	4,0x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	30
14	1,7x10 ⁴	NC	0	NC	0	NC	0	NC.	40
15	3,0x10 ⁶	5,0x10 ³	0	0	1,9x10 ⁴	0	0	0	33
16	3,2x10 ⁶	2,5x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	34
17	4,9x10 ⁶	5,4x10 ⁶	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 6,0x10 ⁵	<i>C.glabrata</i> 2,2x10 ⁶	38
18	2,0x10 ¹	0	0	0	0	0	0	0	35
19	1,9x10 ⁴	1,8x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	37
20	>6,0x10 ⁸	1,4x10 ⁷	0	0	0	0	0	0	39
148	3,6x10 ⁵	6,7x10 ⁶	0	0	4,6x10 ⁴	1,1x10 ⁷	0	<i>C.glabrata</i> 8,6x10 ⁷	168
149	3,1x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	167
150	3,7x10 ⁶	3,6x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	174
151	3,2x10 ⁷	9,1x10 ⁶	0	0	1,0x10 ⁷	1,5x10 ⁷	<i>C.glabrata</i> 9,0x10 ⁷	<i>C.glabrata</i> 8,0x10 ⁷	169
152	2,3x10 ⁷	7,2x10 ⁶	0	0	0	1,4x10 ²	0	0	175

Legenda: colh., colheita.; NC; paciente não compareceu

Das 21 amostras restantes (vide tabela 1), apenas 2 (amostras 35 e 167) em relação à *Candida albicans*, 1 (amostra 24) em relação à *Candida krusei* e 3 (amostras 36, 27 e 33) em relação à *Candida tropicalis*, não apresentaram as referidas leveduras após 21 dias de realização dos procedimentos controle, ou seja, escovação da prótese 3 vezes ao dia com escova de cerdas macias Bitufo® (Valinhos, São Paulo, Brasil) e água. No entanto, nenhum paciente teve sua prótese isenta de todas as espécies de leveduras pesquisadas após os 21 dias de realização do procedimento de higienização controle, o que parece demonstrar que apenas a escovação não é o suficiente para eliminar todas as espécies de leveduras do gênero *Candida*, que podem estar contaminando uma prótese dentária.

Tabela 2 – Nível de contaminação de próteses totais superiores, por estreptococos do grupo mutans e aeróbios totais, durante a 1ª e a 2ª colheitas – grupo controle.

Amostras 1ªcolheita	Estreptococos do grupo mutans		Aeróbios totais		Amostras (2ª colheita)
	1ªcolh.	2ªcolh.	1ªcolh.	2ªcolh.	
1	$>6,0 \times 10^8$	0	$8,0 \times 10^6$	$6,3 \times 10^5$	25
2	$6,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$5,2 \times 10^6$	23
3	$1,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	31
4	$6,4 \times 10^6$	$7,4 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	26
5	$2,8 \times 10^5$	$9,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$	$4,7 \times 10^6$	29
6	$1,9 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$>6,0 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	36
7	$1,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$	21
8	0	0	$2,8 \times 10^7$	$>6,0 \times 10^8$	32
9	$1,4 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$	$>6,0 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	27
10	0	0	$1,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	28
11	$8,2 \times 10^6$	—	$2,4 \times 10^6$	$>6,0 \times 10^8$	24
12	$1,3 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^6$	$>6,0 \times 10^8$	22
13	$2,0 \times 10^1$	$3,3 \times 10^6$	$8,1 \times 10^2$	$5,4 \times 10^7$	30
14	$1,3 \times 10^7$	NC.	$1,4 \times 10^6$	NC	40
15	$6,6 \times 10^6$	0	$>6,0 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	33
16	$1,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	34
17	$1,2 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^7$	$>6,0 \times 10^8$	38
18	$1,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	35
19	$1,1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$	37
20	0	0	$>6,0 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	39
148	$2,8 \times 10^7$	0	$4,4 \times 10^6$	$>6,0 \times 10^8$	168
149	0	0	$2,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	167
150	$1,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	174
151	$2,4 \times 10^6$	0	$2,8 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	169
152	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	175

Legenda: colh., colheita.; NC; paciente não compareceu —, não foi possível a contagem

Conforme a tabela 2, dos 25 pacientes iniciais, 1 não compareceu para a 2ª colheita (amostra 14) e 4 (amostras 8, 10, 20 e 149) não apresentaram estreptococos do grupo mutans, em suas próteses, quando da 1ª colheita; sendo portanto excluídos. Assim, em apenas 4 amostras (amostras 25, 33, 168 e 169) o procedimento controle foi capaz de reduzir a zero o nº de estreptococos do grupo mutans, o que parece demonstrar que apenas a escovação não é suficiente para eliminar este grupo de bactérias das próteses totais. Quanto aos aeróbios totais, estes estiveram presentes em todas as próteses, tanto antes como após a realização do procedimento controle.

Tabela 3 - Nível de contaminação de prótese totais superiores, por leveduras do gênero *Candida*, antes (1ª colheita) e após (2ª colheita) o uso de Corega-Tabs, por 21 dias

Amostras 1ª colheita	<i>C.albicans</i>		<i>C.krusei</i>		<i>C.tropicalis</i>		Outras Candidas		Amostras 2ª colheita
	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	
41	0	0	0	0	4,4x10 ⁵	2,2x10 ²	0	0	63
42	9,4x10 ⁴	3,3x10 ⁴	0	0	3,2x10 ⁴	1,4x10 ³	<i>C.glabrata</i> 3,0x10 ⁴	<i>C.glabrata</i> 5,1x10 ⁴	68
43	9,2x10 ⁶	8,6x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	75
44	1,7x10 ⁶	1,8x10 ⁶	0	0	2,1x10 ⁵	2,8x10 ⁵	0	0	64
45	0	0	0	0	0	0	0	0	66
46	8,3x10 ⁴	3,3x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	61
47	2,8.x10 ⁶	9,6x10 ⁶	0	0	1,1x10 ⁷	6,8x10 ⁶	<i>C.glabrata</i> 1,0x10 ⁷	<i>C.glabrata</i> 1,8x10 ⁷	62
48	1,3x10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	73
49	4,4x10 ⁶	1,2x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	67
50	0	0	0	0	0	0	0	0	69
51	1,8x10 ⁵	5,0x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	74
52	0	0	0	0	0	5,2x10 ⁶	0	0	70
53	0	NC	0	NC	0	NC	0	NC	NC
54	1,8x10 ⁵	2,2x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	65
55	3,2x10 ⁵	3,0x10 ⁶	0	0	4,8x10 ⁴	0	0	0	72
56	0	0	0	0	0	0	0	0	-
57	4,2x10 ⁵	2,6x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	71
176	0	NC.	0	NC.	0	NC.	0	NC.	NC.
179	3,5x10 ⁵	NC	0	NC	1,1x10 ⁶	NC	0	NC	NC
180	9,2x10 ⁵	4,0x10 ⁵	0	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 8,0x10 ³	196
181	2,7x10 ⁶	1,2x10 ⁷	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 4,0x10 ⁴	<i>C.glabrata</i> 8,0x10 ⁶	198
182	0	NC	0	NC	0	NC	0	NC	NC
183	1,0x10 ⁶	2,6x10 ⁶	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 5,0x10 ⁶	<i>C.glabrata</i> 1,4x10 ⁶	193
184	1,6x10 ⁵	1,3x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	197
185	1,1x10 ⁶	1,2x10 ⁶	0	0	2,0x10 ⁴	0	<i>C.glabrata</i> 7,2x10 ⁶	<i>C.glabrata</i> 1,2x10 ⁷	192
186	2,4x10 ⁴	3,8x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	194
187	2,0x10 ¹	1,2x10 ²	0	0	0	0	0	0	195
199	0	0	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 7,4x10 ⁴	0	211
209	2,8x10 ⁸	6,0x10 ⁶	0	0	1,6x10 ⁶	2,1x10 ⁷	<i>C.glabrata</i> 7,6x10 ⁷	<i>C.glabrata</i> 1,5x10 ⁸	220

Legenda: colh., colheita.; NC; paciente não compareceu.

Como se pode verificar na tabela 3, dos 29 pacientes que participaram do grupo corega-tabs, 4 não compareceram para a 2ª colheita e 4 não portavam leveduras do gênero *Candida* em suas próteses, no momento da 1ª colheita; sendo portanto excluídos. Na 2ª colheita, foi observado que, dos 21 pacientes analisados, apenas 1 não apresentou sua prótese recolonizada por *C. albicans*; em 2 não mais se detectou *C. tropicalis* e em outro paciente não foi verificada a presença de *C. glabrata*.

Tabela 4 - Nível de contaminação de próteses totais superiores, por estreptococos do grupo mutans e aeróbios totais, antes (1ª colheita) e após uso de Corega Tabs, por 21 dias.

Amostras 1ª colheita	Estreptococos do grupo mutans		Aeróbios totais		Amostras 2ª colheita
	1ª colheita	2ª colheita	1ª colheita	2ª colheita	
41	0	0	$3,4 \times 10^7$	$8,2 \times 10^6$	63
42	$1,3 \times 10^6$	0	$1,4 \times 10^6$	$5,1 \times 10^4$	68
43	0	0	$2,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	75
44	$5,2 \times 10^6$	0	$1,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	64
45	0	0	$1,1 \times 10^8$	$5,0 \times 10^2$	66
46	0	0	$7,4 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	61
47	0	0	$4,2 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	62
48	$1,9 \times 10^6$	0	$2,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^4$	73
49	0	0	$8,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	67
50	0	0	$2,3 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	69
51	$4,4 \times 10^4$	0	$1,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	74
52	0	$2,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^8$	$2,8 \times 10^7$	70
53	0	NC	$4,1 \times 10^3$	NC	NC
54	$3,6 \times 10^4$	0	$6,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	65
55	$>6,0 \times 10^8$	0	$2,9 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$	72
56	0	NC	0	NC	NC
57	$2,7 \times 10^7$	0	$1,6 \times 10^8$	$1,4 \times 10^6$	71
176	0	NC	0	NC	NC
179	$>6,0 \times 10^8$	NC	-	NC	NC
180	$7,0 \times 10^7$	0	-	-	196
181	$1,0 \times 10^6$	0	-	-	198
182	0	NC	NC	NC	NC
183	$2,1 \times 10^8$	0	-	-	193
184	0	NC	-	NC	197
185	$2,0 \times 10^5$	0	-	-	192
186	$9,8 \times 10^7$	0	-	-	194
187	$1,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$	-	-	195
199	$6,0 \times 10^1$	0	$1,6 \times 10^5$	$8,0 \times 10^1$	211
209	$3,8 \times 10^7$	$6,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	220

Legenda: NC, paciente não compareceu; —, não foi possível a contagem

Em relação aos estreptococos do grupo mutans, das amostras colhidas de 29 próteses, apenas 16 encontravam-se contaminadas por este grupo de bactérias, no momento da 1ª colheita (tabela 4). Dos 16 usuários de próteses, que

apresentavam grupo mutans, 1 não compareceu para a 2ª colheita (179). Das 15 próteses, que apresentaram estreptococos do grupo mutans na 1ª colheita, apenas 2 foram recolonizadas por estas bactérias, após 21 dias do uso de corega-tabs (tabela 4). No tocante aos aeróbios totais, 6 pacientes não compareceram para a 2ª colheita e 6 não tiveram estes microrganismos quantificados na 1ª colheita; sendo portanto descartados para a análise de aeróbios totais. As 17 próteses analisadas mostraram-se contaminadas por aeróbios totais, tanto na 1ª quanto na 2ª colheita (tabela 4).

Tabela 5 - Nível de contaminação de prótese totais superiores, por leveduras do gênero *Candida*, antes (1ª colheita) e após (2ª colheita) o uso do ultra-som

Amostras 1ª colheita	<i>C.albicans</i>		<i>C.krusei</i>		<i>C.tropicalis</i>		Outras Candidas		Amostras 2ª colheita
	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	
81	0	2,0x10 ¹	0	0	0	0	0	0	101
82	9,0.10 ⁵	4,5x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	102
83	0	2,2x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	112
84	3,0x10 ⁷	2,7x10 ⁶	0	0	1,2x10 ⁷	9,0x10 ⁴	0	<i>C.glabrata</i> 2,8x10 ⁵	103
85	1,8x10 ⁵	1,3x10 ⁵	0	0	1,8x10 ⁶	4,0x10 ⁵	1,4x10 ⁶	<i>C.glabrata</i> 2,0x10 ⁵	106
86	0	NC	0	NC	2,0x10 ¹	NC	0	NC	NC
87	2,3x10 ⁶	0	0	0	1,2x10 ³	0	0	0	110
88	2,0x10 ¹	0	0	0	0	0	0	0	104
89	0	0	0	0	0	0	0	0	105
90	0	0	0	0	0	0	0	0	113
91	2,0x10 ⁶	6,0x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	107
92	0	NC	0	NC	1,1x10 ⁵	NC	0	NC	NC
93	1,0x10 ⁶	2,8x10 ⁶	0	0	2,2x10 ⁷	7,6x10 ⁴	<i>C.glabrata</i> 2,0x10 ⁷	0	111
94	5,7x10 ⁴	1,6x10 ⁵	0	0	2,2.x10 ⁵	6,8x10 ⁴	0	0	109
95	0	2,6x10 ²	0	0	0	0	0	0	114
96	2,5x10 ⁶	1,5x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	115
97	9,3x10 ⁶	NC	0	NC	0	NC	0	NC	NC
98	2,0x10 ¹	0	0	0	0	0	0	0	116
99	3,0x10 ⁵	7,0x10 ⁵	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 3,5x10 ⁵	<i>C.glabrata</i> 4,2x10 ⁵	120
100	6,8x10 ⁶	3,9x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	170
141	0	0	0	0	0	0	0	0	173
142	0	0	0	0	0	0	0	0	-
143	2,4x10 ⁵	1,5x10 ⁶	0	0	2,5x10 ⁴	4,0x10 ⁴	0	0	171
144	0	2,0x10 ¹	0	0	4,9x10 ³	4,4x10 ²	<i>C.glabrata</i> 8,0x10 ²	<i>C.glabrata</i> 6,0x10 ¹	172
145	1,3x10 ⁵	2,8x10 ⁶	0	0	0	0			117
146	1,7x10 ⁴	6,8x10 ⁶	0	0	0	0			119.
147	9,0x10 ⁵	2,4x10 ⁶	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 6,2x10 ⁶	<i>C.glabrata</i> 3,2x10 ⁶	118
210	2,5x10 ²	NC	0	NC	0	NC	0	NC	NC

Legenda: colh., colheita.; NC; paciente não compareceu

Observando-se a tabela 5, pode-se verificar que, dos 28 participantes iniciais, 4 não compareceram para a 2ª colheita e 7 não apresentavam qualquer das espécies pesquisadas de *Candida*; sendo, por este motivo, excluídos. O resultado obtido, após a utilização do ultra-som por 15 minutos, na redução de leveduras do gênero *Candida*, foi o seguinte: das 17 próteses amostradas, 1 prótese teve o número de *C. glabrata* reduzido a zero, e outras 3 apresentaram-se livres de *C. albicans*; sendo que, destas três, 1 mostrou-se, também, isenta de *C. tropicalis*, quando da 2ª colheita.

Tabela 6 - Nível de contaminação de próteses totais superiores, por estreptococos do grupo mutans e aeróbios totais, antes (1ª colheita) e após (2ª colheita) o uso do ultra-som.

Amostras 1ª colheita	Estreptococos do grupo mutans		Aeróbios totais		Amostras 2ª colheita
	1ª colheita	2ª colheita	1ª colheita	2ª colheita	
81	0	3,2x10 ⁶	4,0x10 ¹	>6,0x10 ⁸	101
82	1,6x10 ⁷	2,2x10 ⁸	1,1x10 ⁷	1,0x10 ⁷	102
83	0	3,4x10 ⁷	2,0x10 ¹	2,7x10 ⁶	112
84	0	0	4,2x10 ⁷	7,0x10 ⁶	103
85	7,2x10 ⁷	1,8x10 ⁸	3,0x10 ⁷	2,4x10 ⁷	106
86	2,0x10 ⁷	NC	3,3x10 ⁷	NC	NC
87	4,6x10 ⁶	0	1,3x10 ⁷	1,5x10 ⁵	110
88	0	0	2,8x10 ³	2,8x10 ³	104
89	0	0	1,4x10 ³	4,0x10 ¹	105
90	3,8x10 ³	2,8x10 ⁴	7,4x10 ⁵	3,2x10 ⁷	113
91	0	0	2,8x10 ⁶	3,2x10 ⁵	107
92	0	NC	2,8x10 ⁶	NC	NC
93	3,5x10 ⁶	1,4x10 ⁶	5,0x10 ⁷	1,0x10 ⁶	111
94	0	0	>6,0x10 ⁸	3,5x10 ⁸	109
95	1,0x10 ⁴	2,5x10 ⁴	1,7x10 ⁸	5,2x10 ⁵	114
96	6,3x10 ⁵	1,4x10 ⁶	1,8x10 ⁸	1,4x10 ⁸	115
97	0	NC	2,6x10 ⁷	NC	NC
98	0	0	6,0x10 ¹	3,1x10 ⁵	116
99	4,0x10 ⁵	6,0x10 ³	1,0x10 ⁸	5,1x10 ⁷	120
100	9,4x10 ⁶	6,0x10 ⁸	>6,0x10 ⁸	>6,0x10 ⁸	170
141	0	0	3,1x10 ⁵	1,3x10 ⁴	173
142	0	NC	1,7x10 ⁴	NC	NC
143	4,6x10 ⁶	1,6x10 ⁷	7,0x10 ⁷	>6,0x10 ⁸	171
144	0	0	3,6x10 ⁴	4,7x10 ³	172
145	3,3x10 ⁵	1,4x10 ⁶	5,4x10 ⁷	9,0x10 ⁶	117
146	6,6x10 ⁵	2,6x10 ⁶	3,4x10 ⁶	3,5x10 ⁸	119
147	4,6x10 ⁷	6,6x10 ⁶	7,0x10 ⁷	2,4x10 ⁸	118
210	0	NC	4,0x10 ⁷	NC	NC

Legenda: NC; paciente não compareceu

Conforme se pode observar na tabela 6, em relação aos estreptococos do grupo mutans, isolados das próteses totais de 28 pacientes, que inicialmente se dispuseram a participar do grupo do ultra-som, 5 não compareceram para a 2ª

colheita e 10 não apresentaram estreptococos do grupo mutans na 1ª colheita; portanto, de 28 pacientes, apenas 13 finalizaram este experimento. Assim, destes 13 pacientes, em apenas 1 não foram detectados estreptococos do grupo mutans em sua prótese, após esta ter sido submetida ao ultra-som por 15 minutos. Quanto aos aeróbios totais, como nos outros grupos, estes foram detectados em todas as próteses analisadas, tanto antes como depois da aplicação do procedimento de higienização.

Tabela 7 - Nível de contaminação de prótese totais superiores, por leveduras do gênero *Candida*, antes (1ª colheita) e após (2ª colheita) o uso do corega-tabs® associado ao ultra-som

Amostras 1ª colheita	<i>C.albicans</i>		<i>C.krusei</i>		<i>C.tropicalis</i>		Outras Candidas		Amostras 2ª colheita
	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	1ª colh.	2ª colh.	
200	0	0	0	0	0	0	0	0	212
201	9,5x10 ⁴	2,6x10 ⁶	0	0	1,3x10 ⁶	1,4x10 ⁶	0	0	213
202	6,0x10 ⁶	6,0x10 ⁷	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 2,0x10 ⁵	<i>C.glabrata</i> 1,6x10 ⁸	214
203	1,4x10 ²	7,0x10 ⁶	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 2,7x10 ³	<i>C.glabrata</i> 3,2x10 ⁵	215
204	5,8x10 ⁵	NC	0	NC	0	NC	0	NC	NC
205	3,0x10 ⁵	5,0x10 ⁷	0	0	8,9x10 ⁵	7,2x10 ⁷	0	0	216
206	1,8x10 ⁷	3,8x10 ⁷	0	0	0	0	0	0	217
207	0	0	0	0	0	0	0	0	218
208	5,4x10 ²	4,9x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	219
121	>6,0x10 ⁸	NC	0	NC	0	0	0	0	NC
122	1,7x10 ⁶	6,0x10 ¹	0	0	0	0	0	0	164
123	2,8x10 ⁶	NC	0	NC	4,0x10 ⁵	NC	0	NC	NC
124	8,4x10 ⁴	2,2x10 ⁷	0	0	0	0	0	0	153
125	2,1x10 ⁴	1,5x10 ⁶	0	0	0	2,2x10 ⁶	<i>C.glabrata</i> 8,6x10 ⁵	0	159
126	6,0x10 ⁵	3,3x10 ³	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 1,2x10 ⁷	0	158
127	5,0x10 ⁴	3,3x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	157
128	0	NC	0	NC	0	0	<i>C.glabrata</i> 2,0x10 ¹	NC	NC
129	8,0x10 ⁵	1,2x10 ⁸	0	0	0	2,0x10 ⁶	0	0	162
131	3,4x10 ⁵	2,2x10 ⁵	0	0	0	0	<i>C.glabrata</i> 1,4x10 ⁴	<i>C.glabrata</i> 6,2x10 ⁴	161
132	0	0	0	0	0	0	0	0	-
133	0	0	0	0	0	0	0	0	-
134	4,7x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	155
135	7,7x10 ²	3,4x10 ²	0	0	0	0	0	0	154
136	1,4x10 ⁶	2,8x10 ⁶	0	0	0	1,2x10 ⁴	<i>C.glabrata</i> 6,6x10 ³	<i>C.glabrata</i> 8,6x10 ⁴	156
137	0	0	0	0	0	0	0	0	-
138	5,1x10 ³	1,3x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	163
139	4,0x10 ³	NC	0	NC	0	NC	<i>C.glabrata</i> 1,5x10 ⁴	NC	NC
140	2,3x10 ⁵	1,6x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	165
177	0	6,4x10 ³	0	0	0	0	0	0	189
178	0	0	0	0	0	0	0	0	190
188	0	0	0	0	0	0	0	0	191

Legenda: colh., colheita.; NC; paciente não compareceu.

Dos 31 pacientes, que inicialmente integravam o grupo Corega-tabs® associado ao ultra-som, apenas 18 concluíram o experimento, posto que 5 faltaram à 2ª colheita, e em 8 não foram detectadas leveduras do gênero *Candida* quando da 1ª colheita. Conforme consta da tabela 7, pode-se observar que, em apenas 1 prótese a *C. albicans* foi reduzida a zero após a associação dos citados procedimentos de higienização; ao passo que a *C. glabrata* foi reduzida a zero em apenas duas próteses.

Tabela 8 – Nível de contaminação de próteses totais superiores, por estreptococos do grupo mutans e aeróbios totais, antes (1ª colheita) e após (2ª colheita) o uso de Corega Tabs® associado ao ultra-som.

Amostras 1ª colheita	Estreptococos do grupo mutans		Aeróbios totais		Amostras 2ª colheita
	1ª colheita	2ª colheita	1ª colheita	2ª colheita	
200	$3,9 \times 10^2$	0	$1,0 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5$	212
201	$1,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^8$	213
202	$2,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	214
203	$2,4 \times 10^4$	0	$4,7 \times 10^4$	$4,8 \times 10^6$	215
204	0	NC.	$4,1 \times 10^8$	NC	NC
205	$2,0 \times 10^8$	0	$>6,0 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	216
206	$1,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	217
207	$8,0 \times 10^1$	0	$5,2 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	218
208	$7,3 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$1,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	219
121	$2,6 \times 10^3$	NC	$>6,0 \times 10^8$	NC	NC
122	0	0	$1,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^3$	164
123	$1,4 \times 10^2$	NC	$1,8 \times 10^7$	NC	
124	$2,5 \times 10^7$	0	$5,4 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$	153
125	0	0	$4,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	159
126	0	0	$1,5 \times 10^7$	$3,1 \times 10^3$	158
127	$>6,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^5$	$5,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	157
128	0	NC.	$3,7 \times 10^3$	NC	NC
129	$>6,0 \times 10^8$	0	$>6,0 \times 10^8$	$>6,0 \times 10^8$	162
131	$1,4 \times 10^5$	0	$8,8 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	161
132	$8,8 \times 10^6$	NC	$4,7 \times 10^7$	NC	NC
133	0	NC	$5,0 \times 10^2$	NC	NC
134	0	0	$8,0 \times 10^3$	$5,3 \times 10^4$	155
135	0	0	$1,2 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2$	154
136	$3,4 \times 10^7$	0	$4,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	156
137	0	NC	$2,0 \times 10^1$	NC	NC
138	$7,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	163
139	0	NC	$8,0 \times 10^3$	NC	NC
140	$1,2 \times 10^8$	$7,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	165
177	$1,5 \times 10^8$	0	-	-	189
178	$1,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	-	-	190
188	$7,8 \times 10^6$	0	-	-	191

Legenda: NC; paciente não compareceu

De acordo com a tabela 8, dos 31 pacientes que participaram da 1ª colheita, 10 não apresentavam estreptococos do grupo mutans em suas próteses nesta ocasião, e 3 não compareceram à 2ª colheita, sendo portanto excluídos. Dos 18 restantes, em 10 foi constatada ação antimicrobiana frente aos estreptococos do grupo mutans, após a utilização de Corega-tabs® por 5 minutos, durante 21 dias, associada ao uso de ultra-som, por 15 minutos no 21º dia após o início do uso de Corega - tabs®, o que parece demonstrar que a associação Corega-tabs® e ultra-som é eficiente na eliminação de estreptococs do grupo mutans das próteses totais.

5.1 Análise Estatística

Como relatado no item acima para cada grupo especificamente, apesar de terem sido colhidas, no total, amostras de 113 próteses, apenas 77 amostras foram consideradas para análise estatística, posto que foram excluídas, em relação às leveduras, as amostras que não apresentaram nenhuma espécie do gênero *Candida* quando da 1ª colheita; e em relação aos estreptococos foram excluídas as amostras que não apresentaram estreptococos do grupo mutans quando da 1ª colheita, assim como as amostras cujos usuários não compareceram para a 2ª colheita. Desta forma as amostras ficaram distribuídas de acordo com cada tratamento e microrganismos, conforme mostra a tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição das amostras de prótese, de acordo com os tratamentos e microrganismos pesquisados

MICRORGANISMOS	TRATAMENTOS			
	CONTROLE	COREGA-TABS	ULTRA-SOM	ULTRA-SOM+COREGA-TABS
<i>Candida sp</i>	21	21	17	18
Grupo mutans	21	15	13	18

Previamente à análise dos resultados, os dados obtidos para as contagens foram transformados de acordo com a fórmula $\log(\text{UFC}+1)/\text{mL}$. Os quatro tratamentos foram comparados por microrganismo, por meio do teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA, seguido pelo teste de Dunn ou HSD de Tukey respectivamente, para comparações múltiplas. O teste a ser empregado dependeu da aderência ou não à distribuição normal, sendo que para todas as espécies testadas houve homogeneidade de variâncias (teste de Levene, $P>0,05$). O programa SPSS 12.0.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, Ill, EUA) foi utilizado para as análises. A significância estatística foi ajustada para $\alpha=0,05$.

A Figura 1 apresenta os valores transformados para *C. albicans*, estreptococos do grupo mutans e aeróbios totais. A Tabela 1 contém os resultados da ANOVA a um fator, para os dois microrganismos e contagem de aeróbios. Observa-se que os três tratamentos estudados não modificaram a contagem de *C. albicans* em relação aos valores encontrados no controle. Os estreptococos do grupo mutans foram reduzidos significativamente por meio do uso das pastilhas efervescentes, bem como pelo uso da associação das pastilhas efervescentes ao ultra-som. Contudo, o simples uso do ultra-som não apresentou redução significativa na contagem dos estreptococos do grupo mutans. Os aeróbios totais tiveram uma redução significativa com o uso da pastilha efervescente, sendo que os demais métodos de higienização das próteses apresentaram níveis intermediários de ação antimicrobiana frente aos aeróbios totais, em relação ao grupo controle.

Figura 1. Resultados médios e respectivos desvios padrão para as contagens de *C. albicans*, estreptococos do grupo mutans e aeróbios totais. Letras similares indicam semelhança entre os tratamentos, dentro da mesma espécie (Teste HSD de Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabela 10. ANOVA a um fator para *C. albicans*, estreptococos do grupo mutans e aeróbios totais.

Espécie	Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>C. albicans</i>	Tratamentos	6,32	3	2,11	0,39	0,761 (ns)
	Resíduo	394,92	73	5,41		
	Total	401,23	76			
Estreptococos do grupo mutans	Tratamentos	260,94	3	86,98	11,55	<0,001*
	Resíduo	459,46	61	7,53		
	Total	720,40	64			
Aeróbios totais	Tratamentos	26,94	3	8,98	4,06	0,011*
	Resíduo	114,91	52	2,21		
	Total	141,84	55			

(ns) Não significativa, $P>0,05$;

* Significante, $P<0,05$.

Os demais microrganismos, devido à distribuição das contagens, foram descritos e analisados conforme método não paramétrico. A levedura *C. krusei* não foi encontrada em nenhuma ocasião. Os resultados para *C. tropicalis* podem ser observados na Fig. 2. Dentre as demais espécies do gênero *Candida*, a *C. glabrata* foi isolada com relativa freqüência, e esses resultados também se encontram na Fig. 2. Nenhuma das duas leveduras foi influenciada pelos tratamentos testados, de maneira significativa (teste de Kruskal-Wallis, KW=0,38, P=0,944 – *C. tropicalis*; KW=0,99, P=0,803 – *C. glabrata*).

Figura 2. Gráfico tipo *box-plot* referente às contagens transformadas para as leveduras *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

6. *DISCUSSÃO*

A eficácia dos métodos de higienização físicos e químicos para remoção do biofilme das próteses totais tem sido amplamente discutida na literatura, juntamente com uma grande diversidade de agentes higienizadores. Não existe ainda um consenso de qual método é o mais eficiente, visto que estudos comparativos mostram resultados contraditórios em relação aos métodos e agentes utilizados; sendo observado em alguns casos superioridade do método químico (CHAN et al., 1991; DILLS et al., 1988; KULAK et al. 1997; McCABE; MURRAY; KELLY, 1995) e em outros casos, superioridade do método físico (GWINETT; CAPUTO, 1983; MOORE; SMITH; KENNY, 1984; PALENIK; MILLER, 1984; RAAB et al., 1991).

Perante a dificuldade dos pacientes, usuários de próteses totais, em saber qual método deve ser utilizado para a higienização de suas próteses, a presente pesquisa foi realizada com o intuito de desenvolver um protocolo de desinfecção de próteses totais. Para isto, as pastilhas efervescentes foram selecionadas como método químico, devido a sua grande popularidade por parte destes pacientes, além de ser um método bastante conhecido no meio científico como sendo eficaz e de fácil utilização; e por não provocar danos ao material das próteses. E o ultra-som foi selecionado como método físico, por ter tido grande destaque em alguns trabalhos como sendo um método eficaz e rápido.

Esta pesquisa portanto objetivou, especificamente, avaliar a ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre estreptococos do grupo mutans, presentes em próteses totais.

A contagem das leveduras foi realizada, posto que estas constituem importantes agentes etiológicos na indução da candidíase atrófica (BARBACHAN et al., 1995; BARBEAU et al., 2003; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; BUDTZ-

JORGENSEN; BERTRAM, 1970; CATALAN; HERRERA; MARTINEZ, 1987; DAVENPORT, 1970; GRIMOUD et al., 2005; OLSEN, 1974; WILSON, 1998; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU) e a contagem dos estreptococos do grupo mutans também foi realizada, uma vez que estas bactérias são grandes responsáveis pela formação do biofilme inicial da prótese, além de favorecerem a aderência de outros microrganismos e de apresentarem íntima relação com diversos processos patológicos.

No que tange aos resultados, as freqüências de estreptococos do grupo mutans (64%) ora detectadas em amostras de próteses totais, estão próximas daquelas apontadas por Carlsson, Soderholm e Almfeldt (1969) que, ao colherem amostras de biofilme de próteses totais de vinte desdentados, constataram a prevalência de *S. mutans* em catorze dos pacientes, ou seja, em 70% das próteses analisadas; já Monroy et al. (2005) verificaram a presença de *S. mutans* em 49,5% das próteses totais analisadas.

A alta freqüência de isolamento de estreptococos do grupo mutans em próteses totais pode estar relacionada à redução do fluxo salivar observada em pacientes idosos e à própria prótese, que apresenta uma superfície favorável à colonização destas bactérias.

Outro aspecto a ser considerado é o da dieta, que tende a ser modificada com o decorrer da idade. Idosos tendem a preferir alimentos moles, por serem fáceis de mastigar, engolir e digerir. Infelizmente este tipo de dieta, além da consistência, freqüentemente contém carboidratos, que favorecem o crescimento de certos microrganismos, especialmente os dos estreptococos do grupo mutans. (NARHI; AINAMO; MEURMANN, 1994a).

Quanto aos resultados, ora obtidos em relação às freqüências de leveduras do gênero *Candida* (79%), estão próximos daqueles apontados por Davenport (1970) que constatou a presença de leveduras em 60% dos pacientes sem estomatite; já Candido, Azevedo e Ito (1995) constataram a presença de leveduras do gênero *Candida* em 100% das próteses analisadas.

Semelhantemente a outros estudos (BARBEAU et al., 2003; BUDTZ-JORGENSEN et al., 2000; GRIMOUD et al., 2005; PARANHOS, 1996; PIRES et al, 2002 e SALLES, 2006) a *Candida albicans* foi a espécie mais freqüentemente isolada (73%) das próteses totais, concordando também com o achado de Candido, Azevedo e Ito (1995) de 77,9%; em seguida, com menor prevalência, foram detectadas a *Candida tropicalis* (25%) e a de *Candida glabrata* (20%).

Vandenbussche e Swinne (1984) mostraram que das leveduras isoladas da cavidade oral de portadores de próteses totais com mucosa saudável, 82% eram *C. albicans*, 48% *C. glabrata*, e que estas duas espécies estavam associadas em 41% dos casos; já no presente estudo, a incidência de *Candida albicans* associada à *glabrata* foi de 19%; a de *Candida albicans* associada à *tropicalis* foi de 21% e a freqüência de detecção da associação *Candida albicans*, *tropicalis* e *glabrata* foi de 7%.

Assim, os resultados deste estudo, no que se refere às leveduras, sugerem que as espécies *tropicalis* e *glabrata* estão freqüentemente associadas à presença de *Candida albicans*, o que está de acordo com as observações realizadas por Barbeau et al. (2003), Grimoud et al. (2005), Paranhos (1996), Salles (2006) e Webb, Thomas e Whittle (2005).

No entanto, ao contrário de Olsen (1974) que constatou que as espécies de leveduras mais freqüentes na cavidade oral de portadores de próteses totais

eram a *albicans* e a *glabrata*, este trabalho constatou uma maior frequência das espécies *albicans* e *tropicalis*.

A alta frequência de leveduras do gênero *Candida* presente na cavidade oral de pacientes usuários de próteses totais pode estar relacionada ao sistema imunológico do hospedeiro, ao sinergismo entre as leveduras e as bactérias e à produção de hidrolases e outros metabólitos, considerados fatores de virulência destes fungos (NIKAWA et al., 2001). Além disso, outros fatores também podem estar diretamente relacionados e favorecendo o desenvolvimento destas leveduras, tais como: a redução do fluxo salivar dos pacientes idosos e a presença de rugosidades e microporosidades, constantemente observadas na superfície da resina acrílica das próteses totais.

Ademais, a ingestão de carboidratos gera um pH ácido na saliva, que favorece o metabolismo fermentativo de *C. albicans* e de *S. mutans*, permitindo o desenvolvimento destes microrganismos e promovendo sua aderência. (MONROY et al., 2005).

Quanto aos tratamentos pesquisados, verificou-se que, a pastilha efervescente utilizada por 5 minutos ao dia durante 21 dias, reduziu significativamente o número de estreptococos do grupo mutans e de aeróbios totais das próteses, quando comparada ao controle (escovação com água), mas não influenciou de maneira significativa a quantidade de *Candida albicans* detectadas nas próteses totais.

Estes dados estão de acordo com os encontrados por Dills et al. (1988), o qual relatou que a imersão química em peróxido alcalino produz ampla atividade antimicrobiana contra cocos Gram-positivos facultativos (*Streptococcus*) e por Drake, Wells e Ettinger (1992) que observaram que as pastilhas efervescentes à base de

peróxido alcalino foram eficientes em eliminar *S. mutans*, mas não *C. albicans*, cuja redução foi mínima nas próteses amostradas. Também, Gornitsky et al. (2002) demonstraram que as pastilhas efervescentes apresentaram ação antimicrobiana significativa em relação ao controle, quando utilizada por um período de 21 dias.

Por outro lado, o resultado do presente estudo se contrapõe aos encontrados por Nakamoto, Tamamoto e Hamada (1991) e por Nikawa et al. (1995) que constataram que o produto à base de peróxido alcalino teve uma forte atividade fungicida e foi efetivo na remoção de *Candida albicans*. No entanto, diferentemente da presente pesquisa, o estudo de Nakamoto, Tamamoto e Hamada (1991) foi realizado *in vitro*. Além disso, para a realização do teste fungicida, os autores adicionaram 5mL de suspensão de células de *Candida albicans* diretamente a 5mL de solução de peróxido alcalino contida num tubo. Após a incubação deste tubo a 37°C por até 120 min, a solução foi diluída, semeada em meio de cultura e incubada por 24 horas. Para o teste de remoção de *Candida albicans*, 6 discos de resina acrílica foram recobertos por 20 mL de suspensão fúngica, após incubação a 37°C por 90 min, e foram imersos em 50mL de solução de peróxido alcalino por 60 min. Nikawa et al (1995) também realizaram o estudo *in vitro*, e examinaram a eficácia de higienizadores à base de peróxido alcalino sobre um biofilme de *Candida* de 6 dias de formação sobre película de soro humano. Além disso, as amostras colonizadas por fungos foram imersas em 200mL de cada uma das soluções de peróxido alcalino testadas, e foram incubadas conjuntamente às soluções, por um período longo de 2 horas. Já no presente estudo, foi avaliada a ação antimicrobiana do produto à base de peróxido alcalino sobre leveduras do gênero *Candida* presentes em próteses totais “*in vivo*”, desta forma o biofilme analisado continha outros microrganismo, inclusive outras espécies do gênero *Candida*, não apenas cepas padrão de *Candida*

albicans. As próteses foram imersas em 250 mL de solução contendo peróxido alcalino durante 5 minutos e as amostras obtidas foram diluídas, semeadas em meio CHROMagar Candida e incubadas à 37°C por 48hs.

O Corega Tabs® é um produto higienizador à base de peróxido alcalino que, quando dissolvido em água, uma solução química alcalina de peróxido de hidrogênio é obtida. Este peróxido de hidrogênio é um agente oxidante que se decompõe em múltiplas bolhas diminutas de oxigênio, as quais exercem uma ação de desprendimento mecânico do biofilme (PARANHOS, 1996). O peróxido de hidrogênio pode atingir áreas vitais da célula e gerar “*in situ*” os radicais hidroxila (OH), altamente reativos e de efeito devastador. Estes radicais podem danificar membranas celulares, inativar enzimas e quebrar a molécula de DNA cromossômico (JYIOTI, 2003; LINDHE, 1984). Desta forma, são os agentes oxidantes, presentes na composição dos produtos à base de peróxido alcalino, os responsáveis pela ação antimicrobiana das pastilhas efervescentes à base de peróxido alcalino (PALENIK; MILLER, 1984; PAVARINA et al., 2003). Na presente pesquisa, em relação aos estreptococos do grupo mutans e aos aeróbios totais, esta eficiência ficou demonstrada.

Provavelmente, assim como sugeriu Drake, Wells e Ettinger (1992), a produção de uma barreira protetora de glucano por parte do *S. mutans* pode ter limitado a exposição da levedura aos componentes antibacterianos ativos do produto. Apesar da estratificação da massa aderente de *S. mutans* e de *C. albicans* no biofilme de próteses ainda ser desconhecida, segundo os autores citados acima, é bem provável que a *Candida albicans* forme a primeira camada aderente do biofilme, a qual é subsequente coberta por camadas de colônias de *S. mutans*. Assim, a redução substancial de *S. mutans* possivelmente se deva ao fato

de este microrganismo estar presente nas camadas mais superficiais do biofilme, enquanto que a *C. albicans* permanece “protegida”.

Em relação ao ultra-som, os resultados, ora obtidos, são contrários aos observados por Gwinnet e Caputo (1983) e por Palenik e Miller (1984), que relataram uma maior ação antimicrobiana do ultra-som, quando comparado às pastilhas efervescentes. No entanto, tal discrepância, talvez tenha ocorrido, devido às metodologias empregadas terem sido diferentes, bem como o tamanho da amostra. Assim, Gwinnet e Caputo (1983) submeteram ao ultra-som e às pastilhas efervescentes, 10 próteses recém-confeccionadas, que foram contaminadas com saliva de 6 indivíduos, e o teste foi aplicado após a formação *in vitro* de biofilme por 72 horas, enquanto que Palenik e Miller (1984) utilizaram próteses contaminadas apenas com cepas padrão de *S. mutans*, e para o teste foi adicionado à cuba do ultra-som 250,0 mL de água com 27,5 mL de enxaguatório bucal. Além disso, cada pastilha efervescente foi dissolvida em 200,0 mL de água a 48°C e a imersão foi realizada por 12 minutos. Já a presente pesquisa foi realizada “*in vivo*”, de modo que após a profilaxia profissional das próteses, a própria prótese do paciente era reinserida na cavidade bucal, onde permanecia por 21 dias, enquanto o paciente realizava a escovação três vezes ao dia, para então ser submetida ao ultra-som por 15 minutos. Em cada béquer era colocada uma prótese imersa em água esterilizada, e estes eram levados ao ultra-som. No caso das pastilhas, a prótese, que também permanecia na boca do paciente, era submetida diariamente a 5 minutos de contato com o produto, após o paciente ter escovado suas próteses três vezes ao dia, durante 21 dias.

Os resultados do presente estudo quanto ao ultra-som também diferiram dos de Abelson (1981) e dos de Raab et al. (1991). Abelson (1981) relatou que a

efetividade do ultra-som na remoção do biofilme, quando usado apenas com água, foi superior àquela em que o ultra-som foi usado com os produtos à base de peróxido alcalino. No entanto, em seu trabalho, diferentemente do presente estudo, os produtos efervescentes foram testados junto à cuba ultrasônica e não em separado como no presente estudo. Raab et al. (1991) compararam a eficácia do método químico do tipo efervescente com o método físico ultra-som, e concluíram que o método ultra-sônico foi mais efetivo na limpeza de próteses. No entanto, sua metodologia também diferiu da metodologia empregada no presente estudo, visto que as próteses eram removidas diretamente da boca dos pacientes e cortadas para a realização do teste, e não houve a realização de profilaxia profissional previamente ao período teste, como no presente estudo.

No presente estudo, a menor efetividade do ultra-som provavelmente decorreu do fato de não terem sido usadas substâncias químicas simultaneamente ao uso do ultra-som, o que segundo alguns pesquisadores, poderia potencializar a ação antimicrobiana do aparelho. Budtz-Jorgensen (1979), por exemplo, relatou que a limpeza de próteses totais com ultra-som está mais relacionada à atividade química das soluções colocadas dentro do aparelho do que propriamente às propriedades mecânicas deste, e que os higienizadores ultra-sônicos aumentam a capacidade de limpeza de uma solução detergente. Sugere-se esta hipótese, porque no presente estudo as bolhas formadas pela transferência de ondas sonoras para a água contida no béquer, decorrentes da vibração produzida pelo ultra-som, não tiveram ação antimicrobiana especificamente sobre as leveduras do gênero *Candida* e sobre os estreptococos do grupo mutans. O impacto das bolhas de oxigênio, formadas na água, possivelmente não deva ter força ou intensidade suficiente para gerar uma ação bactericida sobre estes microrganismos, posto que o *S.mutans* é um

gram-positivo e como todo gram-positivo possui uma parede celular espessa, contendo peptidoglicano (MURRAY et al., 2002), a qual deve ser resistente à ação mecânica destas bolhas diminutas. As leveduras do gênero *Candida* também apresentam parede celular espessa, constituída de material fibroso depositado em camadas concêntricas (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991) que muito provavelmente, também não sejam rompidas. Talvez se uma solução química tivesse sido testada juntamente ao ultra-som, o resultado fosse outro. No entanto, o intuito de se utilizar apenas água com o ultra-som foi justamente o de testar, exclusivamente, a propriedade mecânica do aparelho em relação aos microrganismos. Em relação aos aeróbios totais, o ultra-som apresentou uma certa ação antimicrobiana, possivelmente devido à presença de gram-negativos dentre estes microrganismos, os quais são dotados de uma parede celular fina, que, possivelmente seja mais fácil de ser rompida pela ação mecânica das bolhas.

Há que se ressaltar que, no presente estudo, quando o ultra-som foi testado após o uso do peróxido alcalino no grupo de associação destes dois produtos, houve uma redução significativa de estreptococos do grupo mutans, e não houve redução no número de leveduras do gênero *Candida*. Este resultado foi estatisticamente semelhante ao do grupo de tratamento que utilizou apenas as pastilhas. Desta forma, os resultados deste grupo confirmaram que as pastilhas efervescentes possuem uma excelente ação antimicrobiana sobre os estreptococos do grupo mutans e que o ultra-som, quando utilizado apenas com água, não tem efetividade sobre os microrganismos testados. Afirma-se isto porque a utilização do ultra-som não potencializou a ação antimicrobiana das pastilhas e não interferiu nos resultados obtidos por estas, ou seja, sua utilização após o uso das pastilhas efervescentes não alterou os resultados.

7. CONCLUSÕES

Pela análise dos dados obtidos pôde-se concluir que:

1. As pastilhas efervescentes foram capazes de reduzir significativamente o número de estreptococos do grupo mutans e de aeróbios totais, mostrando ter uma excelente ação antimicrobiana contra estes microrganismos; no entanto não foram efetivas em combater leveduras do gênero *Candida*.
2. O ultra-som testado apenas com água não foi efetivo na redução do número de estreptococos do grupo mutans e de leveduras do gênero *Candida*; apenas mostrou uma moderada ação antimicrobiana perante os microrganismos aeróbios em geral.
3. A associação pastilhas efervescentes e ultra-som foi efetiva em reduzir estreptococos do grupo mutans e aeróbios totais; mas não foi efetiva em reduzir leveduras do gênero *Candida*.
4. No presente estudo, as espécies de leveduras mais freqüentemente isoladas foram a *C.albicans*, a *C.tropicalis* e a *C.glabrata*.

Esta tese foi realizada com o apoio da FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP.

*REFERÊNCIAS**

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação:
referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABELSON, D.C. Denture plaque and denture cleansers. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.45, n.4, p.376-379, Apr.1981.

ABERE, D.J. Post-placement care of complete and removable partial dentures. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.23, n.1, p.143-151, Jan.1979.

ANDRUCIOLI, M.C.D.; MACEDO, L.D.; PANZERI, H.; LARA, E.H.G.; PARANHOS, H.F.O. Comparison of two cleansing pastes for the removal of biofilm from dentures and palatal lesions in patients with atrophic chronic candidiasis. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.15, n.3, p.220-224, Mar. 2004.

ARENDORF, T.M ; WALKER, D.M. Denture stomatitis: a review. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.14, n.3, p.217-27, May.1987.

AZEVEDO, R.V.P. **O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do grupo mutans.** São Paulo, 1988. 110p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

BAEHNI, P.C.; TAKEUCHI, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. **Oral Dis.**, London, v.9, supp 1, p.23-9, review, 2003.

BARBACHAN, J.J.D.; RADOS, P.V.; SANT'ANA FILHO, M; DOMINGUES, M.G. Estudo clínico de estomatite protética: avaliação preliminar. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, Porto Alegre, v.36, n.1, p.27-31, Ago.1995.

BARBEAU, J.; SEGUIN, J.; GOULET, J.P.; KONINCK, L.; AVON, S.L.; LALONDE, B.; ROMPRÉ, P.; DESLAURIERS, N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture related stomatitis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v.95, n.1, p.51-9, Jan. 2003.

BARNABÉ, W.; MENDONÇA NETO, T.; PIMENTA, F.C.; PEGORARO, L.F.; SCOLARO, J.M. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.31, n.5, p.453-459, May. 2004.

BARTHOLOMEW, G.A.; RODU, B.; BELL, D.S. Oral candidiasis in patients with diabetic mellitus. A through analysis. **Diabetes Care**, New York, v.10, n.5, p.607-12, Sept-Oct.1987.

BERDICEVSKY, I.; BEN-ARYEH, H.; SZARGEL, R.; GUTMAN, D. Oral *Candida* asymptomatic dentures wearers. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v.9, n.2, p.113-115, Apr. 1980.

BERGENDAL, T.; ISACSSON, G. A combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v.41, n.1, p.33-44, 1983.

BUDTZ-JORGENSEN, E. Evaluation of dehydrated test strip, microstix®-Candida, for detection of *Candida* - induced denture stomatitis, Copenhagen, **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.84, n.4, p.229-233, Jul. 1976.

BUDTZ-JORGENSEN, E. Materials and methods for cleaning dentures. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.42, n.6, p.619-623, Dec. 1979.

BUDTZ-JORGENSEN, E. Prevention of denture plaque formation by an enzyme denture cleanser. **J. Biol. Buccale**, Paris, v.5, n.3, p.239-44, Sep. 1977.

BUDTZ-JORGENSEN, E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.82, n.2, p.151-190, Jan. 1974

BUDTZ-JORGENSEN, E.; BERTRAM, U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v.28, n.1, p.71-92, Mar. 1970.

BUDTZ-JORGENSEN, E.; LOE, H. Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.80, n.6., p. 457-64, 1972.

BUDTZ-JORGENSEN, E.; MOJON, E.; RENTSCH, A.; DESLAURIERS, N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.28, n.2, p.141-9, Apr. 2000.

BUDTZ-JORGENSEN, E.; STENDERUP, A.; GRABOWSKI, M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.3, n.3, p.115-119, May. 1975.

BUDTZ-JORGENSEN, E.; THEILADE, E. Regional variations in viable bacterial and yeast counts of 1-week-old denture plaque in denture-induced stomatitis. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.91, n.4, p.288-295, Aug. 1983.

BUDTZ-JORGENSEN, E.; THEILADE, E.; THEILADE, J. Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.91, n.2, p.134-142, Apr. 1983.

CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; ITO, I.Y. Leveduras: Prevalência na cavidade bucal de portadores e não portadores de prótese total. **Rev. Odontol. UNICID.**, São Paulo, v.7, n.1, p.27-33, Jan/Jun. 1995.

CARLSSON, J.; SODERHOLM, G.; ALMFELDT, I. Prevalence of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* in the mouth of persons wearing full-dentures. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v.14, n.3, p.243-249, Mar. 1969.

CARTER, K.; LANDINI, G.; WALMSLEY, A.D. Plaque removal characteristics of electric toothbrushes using na in vitro plaque model. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.28, n.11, p.1045-9, Nov. 2001

CARVALHO, L.C.; CORMACK, E.F. O cuidado dos idosos com suas próteses dentárias. **RBO**, Rio de Janeiro, v.60, n.3, p.167-169, May-Jun., 2003.

CATALAN, A.; HERRERA, S.; MARTINEZ, A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: scanning electron microscopic and microbiologic study. **J. Prosthet. Dent.**, St.Louis, v.57, n.5, p.581-6, May.1987.

CATALANOTTO, F.A.; SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J. Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.91, n.3, p.606-9, Sep.1975.

CHAN, E.C.S.; IUGOVAZ, I.; SIBOO, R.; BILYK, M.; BAROLET, R.; AMSEL, R.; WOOLEY, C.; KLITORINOS, A. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v.57, n.12, p.937-939, Dec. 1991.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; LEIDICH, S.D.; FADDOUL, F.F.; HOYER, L.L.; DOUGLAS, L.J.; GHANNOUM, M.A. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. **J. Dent. Res.**, Washington, v.80, n.3, p.903-8, Mar. 2001.

CIANCIO, S. Electric toothbrushes - for whom are they designed? **Adv. Dent. Res.**, Washington, v.16, n.1, p.6-8, May. 2002

CONNOR, J.N.; SCHOENFELD, C.M.; TAYLOR, R.L. An evaluation of an enzyme denture cleanser. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.37, n.2, p. 147-57, Feb.1977.

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

DAVEY, A.L.; ROGERS, A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v.29, n.6, p.453-60, 1984.

DENTINO, A.R.; DERDERIAN, G.; WOLF, M.; CUGINI, M.; JOHNSON, R.; Van SWOL, R.L.; KING, D.; MARKS, P.; WARREN, P. Six-month comparison of powered versus manual toothbrushing for safety and efficacy in the absence of professional instruction in mechanical plaque control. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, n.7 p.770-8, Jul.2002.

DILLS, S.S.; OLSHAN, A.M.; GOLDNER, S.; BROGDON, C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.60, n.4, p.467-470, Oct. 1988.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.15, n.2, p.167-193, Apr. 2002

DOUGLAS, L.J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v.19, n.3, p. 139-143, Sep.2002.

DRAKE, D.; WELLS, J.; ETTINGER, R. Efficacy of denture cleansing agents in an in vitro bacteria-yeast colonization model. **Int. J. Prosthodont.**, Lombardt, v.5, n.3, p.214-20, May-June. 1992.

EDGERTON, M.; LEVINE, M.J. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. **J. Prosth. Dent.**, St. Louis, v.68, n.4, p.683-91, Oct. 1992.

ELLEPOLA, A.N.; SAMARANAYAKE, L.P. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. **Oral Dis**, Munksgaard, v.7, n.1, p.11-17, Jan. 2001.

FRANK, R.M.; STEUER, P. Transmission electron microscopy of plaque accumulations in denture stomatitis. **J. Prosth. Dent.**, St. Louis, v.53, n.1, p.115-24, Jan. 1985.

GARCIA JUNIOR, A. **Avaliação da eficácia dos desinfetantes químicos na desinfecção de resina acrílica termopolimerizável**. Ribeirão Preto, 2002, 101p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GIBBONS, R.J.; Van HOUTE, J. On the formation of dental plaque. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.44, n.6, p.347-58, Jun. 1973.

GLASS, R.T.; BULLARD, J.W.; CONRAD, R.S.; BLEWETT, E.L. Evaluation of the sanitization effectiveness of a denture-cleaning product on dentures contaminated with known microbial flora. An in vitro study. **Quintessence Int.**, Berlin, v.35, n.3, p.194-9, Mar. 2004.

GOCKE, R.; GERATH, F.; von SCHWANEWEDE, H. Quantitative determination of salivary components in the pellicle on PMMA denture base material. **Clin. Oral Invest.**, Berlin, v.6, n.4, p.227-53, Oct. 2002.

GORNITSKY, M.; PARADIS, I.; LANDAVERDE, G.; MALO, A.M.; VELLY, A.M. A Clinical and Microbiological Evaluation of Denture Cleansers for Geriatric Patients in Long-Term care Institutions. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v.68, n.1, p.39-45, Jan. 2002.

GRIMOUD, A.M.; LODTER, J.P.; MARTY, N.; ANDRIEU, S.; BOCQUET, H.; LINAS, M.D.; RUTEAU, M.; CAZARD, J.C. Improved oral hygiene and *Candida* species colonization level in geriatric patients. **Oral Dis.**, London, v.11, n.3, p.163-9, May, 2005.

GWINNETT, A.J.; CAPUTO, L. The effectiveness of ultrasonic denture cleaning: a scanning electron microscope study. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.50, n.1, p.20-25, Jul. 1983.

HARRISON, Z.; JOHNSON, A.; DOUGLAS, C.W.I. An 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.**, Oxford, v.31, n.5, p.460-467, May. 2004.

HE, X.Y.; MEURMAN, J.H.; KARI, K.; RAUTEMAA, R.; SAMARANAYAKE, L.P. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. **Mycoses**, Berlin, v.49, n.2, p.80-84, Mar. 2006.

HOAD-REDDICK, G.; GRANT, A.A.; GRIFFITHS, C.S. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. **J. Prosthet Dent.**, Saint Louis, v.64, n.1, p.48-52, Jul.1990.

HÖFLING, J.F.; SPOLIDÓRIO, D.M.P.; PEREIRA, C.V.; ROSA, E.A.R.; MOREIRA, D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.13, n.2, p.173-180, Abr/Jun. 1999.

JEKINSON, H.F.; LALA, H.C.; SHEPHERD, M.G. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other *Streptococci* with *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.58, n.5, p.1429-1436, May. 1990.

JORGE, A.O.C.; BRIOGLIO, L.Z.; ALMEIDA, O.P.; JORGE JR. J. Estomatite por prótese total - Presença de bactérias e fungos. **Arq. Centro Estud. Curso Odontol.**, Belo Horizonte, v.27, n.1/2, p.9-15, Jan-Dez.1990.

JORGE JR, J; DE ALMEIDA, O.P.; BOZZO, L.; SCULLY, C.; GRANER, E. Oral mucosal health and disease in institutionalized elderly in Brazil. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.19, n.3, p.173, Jun.1991.

JYOTI, K.K; PANDIT, A.B. Hybrid cavitation methods for water disinfection: simultaneous use of chemicals with cavitation. **Ultrason. Sonochem**, Oxford, v.10, n.4-5, p.255-264, Jul. 2003

KENG, S.B; LIM, M. Denture plaque distribution and effectiveness of a perborate-containing denture cleanser. **Quintessence Int.**, Berlin, v.27, n.5, p.341-345, May. 1996.

KREHER, J.M.; GRASER, G.W.; HANDELMAN, S.L.. Oral yeasts, mucosal health, and drug use in an elderly denture- wearing population. **Spec. Care Dent.**, Chicago, v.11, n.6, p.222-226, Nov-Dec. 1991.

KOOPMANS, A.S.F.; KIPPUW, N.; GRAAFF, J. Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. **J. Dent. Res.**, Washington, v.67, n.9, p.1246-50, Sep. 1988.

KULAK, Y.; ARIKAN, A.; ALBAK, S.; OKAR, I.; KAZAZOGLU, E. Scanning electron microscopic examination of different cleaners : surface contaminant removal from dentures. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.24, n.3, p.209-215, Mar.1997.

KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A.. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.29, n.3, p.300-304, Mar. 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Morfologia e biologia dos fungos de interesse medico. In:____. **Micologia Médica - Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8ª edição. São Paulo: Sarvier, 1991. p.31-57.

LACAZ, C.S.;PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Leveduras de interesse médico. In:____. **Tratado de micologia médica**. 9ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002. p.123-169.

LAMFON, H.; AL-KARAAWI,Z.; McCULLOUGH,M.; PORTER, S.R.; PRATTEN, J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals, Amsterdam, **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.242, n.2, p.345-351, Jan. 2005.

LAMFON, H.; PORTER, S.R.; McCULLOUGH,M.; PRATTEN,J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.111, n.6, p.465-471, Dec.2003

LAMFON, H.; PORTER, S.R.; McCULLOUGH, M.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **J. Antimicrob. Chemother.** , London, v.53, n.2, p.383-385, Feb. 2004.

LANGWELL, W.H. The clearing of artificial dentares. **Br. Dent. J.**, London, v.15, n.11, p.337-9, Nov.1955.

LAZARDE, L.J.; PACHECO, A. Identificación de especies de *Candida* en un grupo de pacientes con candidiasis atrófica crônica, **Acta Odontol. Venez.**, Caracas, v.39, n.1, p.1-11, 2001

LINDHE, J. Microbiologia da Doença Periodontal associada à placa. In:____. **Tratado de Periodontia Clínica**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p.48-99.

MAKILA, E.; TAULIO-KORVENMAA, A. Denture and oral brush for elderly. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, Helsinki, v.84, n.3, p.197-200, Feb., 1998.

MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v.8, n.2, p.263-271, Jul.1994.

MARSH, P.D.; PERCIVAL, R.S.; CHALLACOMBE, S.J. The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.71, n.7, p.1374-1381, Jul. 1992.

McCABE, J.F.; MURRAY, I.D.; KELLY, P.J. The efficacy of denture cleansers. **Eur. J. Prosthodont. Restor. Dent.**, Larkfield, v.3, n.5, p.203-7, Sep. 1995.

MOLINARI, J.A.; MERCHANT, V.A.; GLEASON, M.J. Controversies in infection control. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 34, n. 1, p. 55-69, Jan. 1990.

MONROY, T.B.; MALDONADO, V.M.; MARTINEZ, F.F.; BARRIOS, B.A.; QUINDÓS, G.; VARGAS, L.O.S. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prostheses. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v.10, n.1, p.27-39, Apr. 2005.

MOORE, T.C.; SMITH, D.E.; KENNY, G.E. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. **J. Prosthet. Dent.**, St.Louis, v.52, n.2, p.158-63, Aug. 1984.

MORGAN, T.; WILSON, M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.91, n.1, p.47-53, Jul. 2001.

MUENCHINGER, F.S. Evaluation of an eletrosonic denture cleaner. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.33, n.6, p.610-614, Jun. 1975

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. Morfologia Bacteriana, Estrutura e Síntese da Parede Celular.In:____. **Microbiologia Médica**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.10-22.

NAIR, R.G.; SAMARANAYAKE, L.P. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. **APMIS**, Copenhagen, v.104, n.5, p.339-349, May. 1996.

NAKAMOTO, K.; TAMAMOTO, M.; HAMADA, T. Evaluation of denture cleansers with and without enzymes against *Candida albicans*. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.66, n.6, p.792-795, Dec.1991.

NARHI, T.O.; AINAMO, A.; MEURMANN, J.H. Mutans streptococci and lactobacilli in the elderly. Scand. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.102, n.2, p.120-125, Apr.1994 a.

NARHI, T.O.; TENOVUO, J.; AINAMO, A.; VILJA, P. Antimicrobial factors, sialic acid, and protein concentration in whole saliva of the elderly. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.102, n.2, p.120-125, Apr.1994 b.

NEILL, D.J. A study of materials and methods employed in cleaning dentures. **Br. Dent. J.**, London, v.124, n.3, p.107-115, Feb.1968.

NEWTON, A.V. Denture sore mouth: a possible aetiology. **Br Dent J**, London,v.112, p.357-360, 1962.

NIKAWA, H.; ERGUSA, H.; MAKIHIRA, S.; YAMASHIRO,H.; FUKUSHIMA, H. JIN, C.; NISHIMURA, M.; PUDJI, R.R. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.16, n.5, p.279-283, Oct. 2001.

NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMAMOTO, T. Denture plaque-past and recent concerns. **J. Dent.**, Bristol, v.26, n.4, p.299-304, May.1998.

NIKAWA,H.; JIN, C.; HAMADA,T.; MAKIHIRA, S.; KUMAGAI, H.; MURATA, H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans in vitro*: Part II. Effects on fungal colonization. **J. Oral Rehabil.**,Oxford, v.27, n.1, p.124-130, Feb. 2000 a.

NIKAWA,H.; JIN, C.; HAMADA,T.; MURATA, H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans in vitro*: Part I. Effects on fungal growth. **J. Oral Rehabil.**,Oxford, v.27, n.2, p.41-51, Feb.2000 b.

NIKAWA, H.; JIN, C.; MAKIHIRA, S.; EGUSA, H.; HAMADA, T.; KUMAGAI, H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers *in vitro*. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.30, n.3, p.243-250, Mar. 2003.

NIKAWA, H.; KUKUSHIMA, H.; MAKIHIRA, S.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKE, L.P. Fungicidal effect of three new synthetic cationic peptides against *Candida albicans*. **Oral Dis.**, Houndmills, v.10, n.4, p.221-228, Jul. 2004.

NIKAWA,H.; NISHIMURA,H.; HAMADA,T.; KUMAGAI,H.; SAMARANAYAKE, L.P. Effects of dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. **Mycopathologia**, The Hague, v.139, n.2, p.87-91, Aug.1997.

NIKAWA, H.; YAMAMOTO, T.; HAMADA, T. Effect of components of resilient denture-lining materials on growth, acid production and colonization of *Candida albicans*. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.22, n.11, p.817-824, Nov. 1995.

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.**, Lombardt, v.8, n.6, p.527-534, Nov-Dec.1995.

NIKAWA, H.; YAMAMOTO, T.; HAYASHI, S.; NIKAWA, Y.; HAMADA, T. Growth and/or acid production of *Candida albicans* on soft lining materials *in vitro*. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.21, n.5, p.595-94, Sept. 1994.

ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, n.8, p.1923-9, Aug.1994.

OLSEN, I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.32, n.5, p.329-33, May.1974.

OOSHIMA, T.; MATSUMURA, M.; HOSHINO, T.; KAWABATA, S.; SOBUE,S.; FUJIWARA, T. Contributions of three glucosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.80, n.7, p.1672-1677, Jul. 2001.

PALENIK, C.J.; MILLER, C.H. In vitro of three denture-cleaning systems. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.51, n.6, p.751-754, Jun. 1984.

PANAGODA, G.J.; ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses**, v.44, n.1-2, p.29-35, Mar. 2001.

PARANHOS, H.F.O. **Experimentação clínica de um dentifrício específico para higienização de próteses totais**. Ribeirão Preto, 1996. 218p. tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

PARANHOS, H.F.O.; PANZERI, H.; LARA, E.H.G.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y. Capacity of denture Plaque/biofilm removal and antimicrobial action of a new denture paste. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.11, n.2, p.97-104, 2000.

PARDI, G.; CARDOZO, E.I. Algunas consideraciones sobre el tratamiento de la estomatitis sub-protésica de origen infeccioso. **Acta Odontol. Venez.**, Caracas, v.40, n.3, p.305-309, 2002.

PAVARINA, A.C.; PIZZOLITTO, A.C.; MACHADO, A.L.; VERGANI, C.E.; GIAMPAOLO, E.T. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.30, n.5, p.532-536, May. 2003.

PEDRAZZI, V. **A presença de sílica espessante e sílica abrasiva em formulações básicas de dentifrícios - alguns aspectos físico-químicos e biológicos**. Ribeirão Preto, 1996. 194p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

PESCI-BARDON, C.; FOSSE, T.; MADINIER, I.; SERRE, D. In vitro new dialysis protocol to assay antiseptic properties of a quaternary ammonium compound polymerized with denture acrylic resin. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.39, n.3, p.226-231, Sep. 2004.

PIRES, F.R.; SANTOS, E.B.D.; BONAN, P.R.F.; ALMEIDA, O.P.; LOPES, M.A.. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.29, n.11, p.1115-9, Nov. 2002.

PITT, W.G.; ROSS, S.A. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. **Biotechnol. Prog.**, New York, v.19, n.3, p.1038-1044, May-Jun. 2003.

QUIRYNEN, M.; MARECHAL, M.; BUSSCHER, H.; EL ABIAD, M.; ARENDES, J.; van STEENBERGHE, D. The influence of surface characteristics on the early bacterial colonization of intra oral hard surfaces. **J. Clin. Dent.**, Yardley, v.1, Supp A, p.14-9, Summer, 1988.

RAAB, F.J.; TAYLOR, C.A.; BUCHER, J.A.; MANN, B.L. Scanning electron microscopic examination of ultrasonic and effervescent methods of surface contaminant removal from complete dentures. **Journal Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.65, n.2, p.255-258, Feb. 1991.

RADFORD, D.R.; RADFORD, J.R. A SEM study of denture plaque and mucosa of denture-related stomatitis. **J. Dent.**, Guildford, v.21, n.2, p.87-93, Apr. 1993.

RAMAGE, G.; TOMSETT, K.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; REDDING, S.W. Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. **Oral Sur. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v.98, n.1, p.53-59, Jul. 2004.

RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v.18, n.4, p. 163-170, Dec. 2001.

ROCHA, EP.; FRANCISCO, S.B.; DEL BEL CURY, A.; CURY, J.A. Longitudinal study of the influence of removable partial denture and chemical control on the levels of *Streptococcus mutans* in saliva. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.30, n.2, p.131-138, Feb. 2003.

RUSTOGI, K.N.; MELLBERG, J.R.; SCHLISSEL, H.J.; HANSEN, K.R.; VOLPE, A.R. The clinical efficacy of denture cleansers. **Q. Natl. Dent. Assoc.**, Los Angeles, v.37, n.3, p.100-6, Apr. 1979.

SALLES, A.E.S. **Análise dos níveis de biofilme em próteses totais com o uso de agentes higienizadores e saliva artificial.** Ribeirão Preto, 2006. 176p. tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

SAMARANAYAKE, Y.H.; WU, P.C.; SAMARANAYAKE, L.P.; SO, M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence and denture acrylic surfaces. **APMIS**, Copenhagen, v.103, n.10, p. 707-713, Oct.1995.

SHAY, K. Denture hygiene: a review and update. **J. Contemp. Dent. Pract.**, Cincinnati, v.1, n.2, p.1-8, Feb. 2000.

STREENIVASAN, P. K.; MATTAI, J.; NABI, N.; XU, T.; GAFFAR, A. A simple approach to examine early oral microbial biofilm formation and effects of treatments. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.19, n.5, p.297-302, Oct. 2004.

TAMAMOTO, M.; HAMADA, T.; MIYAKE, Y.; SUGINAKA, H. Ability of enzymes to remove *Candida*. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v. 53, n.2, p.214-216, Feb. 1985.

TANNER, J.; VALLITTU, P.K.; SODERLING, E. Adherence of *Streptococcus mutans* to an E-glass fiber-reinforced composite and conventional restorative materials used in prosthetic dentistry. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v.49, n.2, p.250-256, Feb. 2000.

TANNER, J.; VALLITTU, P.K.; SODERLING, E. Effect of water storage of E-glass fiber-reinforced composite on adhesion of *Streptococcus mutans*. **Biomaterials**, Guilford, v.22, n.12, p.1613-1618, Jun. 2001.

TAWSE-SMITH, A.; DUNCAN, W.J.; PAYNE, A.G.; THOMSON, W.M. WENNSTROM, J.L. Relative effectiveness of powered and manual toothbrushes in elderly patients with implant-supported mandibular overdentures. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.29, n.4, p.275-80, Apr.2002.

THEILADE, J.; BUDTZ-JORGENSEN, E. Electron microscopic study of denture plaque. **J. Biol. Buccale**, Paris, v.8, n.4, p.287-97, Dec.1980.

THEILADE, J.; BUDTZ-JORGENSEN, E. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with denture-induced stomatitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.3, n.1, p.8-13, Mar. 1988.

THEILADE, J.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; THEILADE, J. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with healthy oral mucosa. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.28, n.8, p.675-80, 1983.

VANDENBUSSCHE, M.; SWINNE, D. Yeasts oral carriage in denture wearers. **Mykosen**, Berlin, v.27, n.9, p.431-5, Sep.1984.

WALTER, B.; FRANK, R.M.; STEUER, P. Ultrastructural development of dated plaque in case of denture stomatitis. **J. Biol. Buccale**, Paris, v.14, n.2, p.115-24, Jul. 1986.

WALTIMO, T.; LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; VALLITU, P.K. Glass fibre-reinforced composite laced with chlorhexidine digluconate and yeast adhesion. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, London, v.15, n.2, p.117-121, Feb. 2004.

WATERS, M.G.J.; WILLIAMS, D.W.; JAGGER, R.G.; LEWIS, M.A.O. Adherence of *Candida albicans* to experimental denture soft lining materials. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.77, n.3, p.306-312, Jan.1997.

WATKINSON, D.C.; McCREIGHT, M.C.; WOIRNOCK, D.W. Prevalence and persistence of different strains of *Candida albicans* in treatment of denture stomatitis. **J. Prosthet. Dent.**, St.Louis, v.53, n.3, p.365-6, Mar.1985.

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

WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WILLCOX, M.D.P.; HARTY, D.W.; KNOX, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in oral cavity. **Aust. Dent. J.**, Sidney, v.43, n.1, p.45-50, Feb. 1998 a.

WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WILLCOX, M.D.P.; HARTY, D.W.; KNOX, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management : a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. **Aust. Dent. J.**, Sidney, v.43, n.3, p.160 -166, Jun.1998 b.

WILSON, J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. **Br. Dental J.**, London, v.185, n.8, p.380-4, Oct.1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Tabelas com os dados dos pacientes**Tabela A1- Dados dos pacientes do grupo Controle**

Nº dos Pacientes	sexo	idade	Tempo de desdentamento superior	Tempo de uso da prótese superior atual
1	F	63	30	20
2	M	75	15	10
3	F	71	30	30
4	F	76	36	36
5	F	54	30	30
6	M	69	20	10
7	F	51	20	10
8	M	58	20	20
9	M	75	20	20
10	F	76	44	44
11	F	66	41	20
12	M	60	20	20
13	F	68	52	52
14	F	62	20	20
15	F	60	20	20
16	M	62	25	20
17	F	64	26	12
18	F	53	17	5
19	M	55	10	10
20	F	77	35	18
148	F	55	33	10
149	F	63	45	45
150	F	60	3	3
151	F	44	25	25
152	F	73	20	20

Tabela A2- Dados dos pacientes do grupo Corega Tabs

Nº dos pacientes	sexo	idade	Tempo de desdentamento superior	Tempo de uso da prótese superior atual
41	F	68	15	10
42	F	69	50	7
43	F	72	30	4
44	F	67	25	10
45	F	64	30	7
46	F	70	30	30
47	F	74	30	30
48	F	54	25	7
49	F	71	35	10
50	F	67	13	13
51	M	84	44	17
52	F	76	18	18
53	F	63	15	4
54	F	50	4	4
55	M	68	41	21
56	F	67	25	5
57	F	63	45	45
176	F	61	36	36
179	M	41	23	23
180	F	62	10	10
181	F	66	40	11
182	F	61	17	17
183	F	63	48	42
184	F	58	20	20
185	F	55	9	9
186	M	69	16	16
187	M	71	47	47
199	F	58	20	10
209	F	49	23	23

Tabela A3- Dados dos pacientes do grupo Ultra-som

Nº dos pacientes	sexo	idade	Tempo de desdentamento superior	Tempo de uso da prótese superior atual
81	F	52	20	20
82	F	79	46	28
83	F	62	10	10
84	F	71	20	20
85	M	41	23	23
86	F	72	30	30
87	F	52	12	12
88	F	76	7	7
89	F	61	36	36
90	M	77	30	30
91	F	53	27	25
92	F	64	5	5
93	F	66	40	30
94	M	72	15	15
95	F	74	40	40
96	F	71	38	35
97	M	46	8	8
98	M	73	25	25
99	F	46	19	18
100	F	67	45	6
141	M	62	44	15
142	F	66	40	40
143	F	64	15	12
144	F	59	30	30
145	F	61	27	27
146	F	71	30	30
147	F	56	10	10
210	M	61	30	6

Tabela A4 - Dados dos pacientes do grupo Corega Tabs e Ultra-som

Nº dos pacientes	sexo	idade	Tempo de desdentamento superior	Tempo de uso da prótese superior atual
200	F	58	30	30
201	F	55	33	10
202	F	71	36	35
203	F	63	48	42
204	F	60	3	3
205	M	41	23	23
206	F	73	20	20
207	F	62	12	12
208	F	66	2	2
121	F	75	59	25
122	F	71	25	10
123	F	78	60	15
124	M	64	41	22
125	M	58	22	22
126	F	54	34	34
127	F	48	23	23
128	F	50	12	7
129	M	72	15	15
131	F	66	40	11
132	M	78	40	40
133	M	72	20	20
134	F	59	20	20
135	F	55	9	9
136	F	63	48	42
137	F	47	3	3
138	F	77	17	5
139	F	77	20	5
140	M	72	10	2
177	F	66	40	8
178	F	75	25	25
188	F	65	30	7

APÊNDICE B: Termos de consentimento

APÊNDICE B1. Grupo Controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO SUJEITO DA PESQUISA

Eu....., RG....., assino este **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** com a finalidade de autorizar a minha participação, como sujeito da pesquisa **Avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina, de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, presentes em próteses totais**, desenvolvida sob a responsabilidade de: Profa. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin (RG - 12.688.834-6) e da Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos (RG - 25.065.136-1), e afirmo que me foram dadas todas as explicações necessárias para eu tomar esta decisão de livre e espontânea vontade, como resumida abaixo: Eu sei que: a) Participarão desta pesquisa, pessoas que usam dentaduras. b) Esta pesquisa tem como objetivo avaliar diferentes métodos de limpeza de dentadura, em relação a sua desinfecção. c) a minha dentadura será corada, para poder enxergar onde acumula mais biofilme (sujeira) e depois um dos pesquisadores desta pesquisa retirará o corante e o biofilme (sujeira) da minha dentadura e me entregará a minha dentadura. d) Terei que escovar a minha dentadura 3 vezes por dia, durante 21 dias. e) No retorno antes e no retorno após, eu ter feito a limpeza da minha dentadura, como explicado acima, terei que entregar a minha dentadura a um dos pesquisadores, para que possa ser feita a colheita do material da minha dentadura; sendo que a minha dentadura me será devolvida, no mesmo dia, após a colheita. j) a colheita do material da minha dentadura será feita por um dos pesquisadores desta pesquisa, escovando a minha prótese, com escova nova, limpa e usada só para a minha dentadura, e enxaguando a minha dentadura com solução fisiológica (água e sal) esterilizada, sei também que estes procedimentos não causarão risco a minha saúde e nem danos a minha dentadura. f) A minha participação nesta pesquisa será voluntária, e que eu posso, a qualquer momento, me recusar a participar desta pesquisa, sem que eu sofra qualquer penalização. g) A minha identificação pessoal será mantida em segredo. h) Nenhum dos procedimentos descritos acima trará riscos para a minha saúde e nem danos para a minha dentadura. i) Não precisarei pagar para participar desta pesquisa. j) Não receberei dinheiro ou qualquer outra espécie de remuneração para eu participar desta pesquisa. l) Qualquer dúvida que eu tiver, poderá ser esclarecida por um dos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa, durante o desenvolvimento desta pesquisa.

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

Ribeirão Preto,.....de.....de.....

.....
Assinatura do Participante/Sujeito da Pesquisa

.....
Assinatura do Pesquisador Responsável pela Clínica

.....
Assinatura do Coordenador da Pesquisa

APÊNDICE B2. Grupo das pastilhas efervescentes (Corega Tabs®)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO SUJEITO DA PESQUISA

Eu,.....,RG....., assino este **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** com a finalidade de autorizar a minha participação, como sujeito da pesquisa **Avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina, de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, presentes em próteses totais**, desenvolvida sob a responsabilidade de: Profa. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin (RG - 12.688.834-6) e da Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos (RG - 25.065.136-1), e afirmo que me foram dadas todas as explicações necessárias para eu tomar esta decisão de livre e espontânea vontade, como resumida abaixo: Eu sei que: a) Participarão desta pesquisa, pessoas que usam dentaduras. b) Esta pesquisa tem como objetivo avaliar diferentes métodos de limpeza de dentadura, em relação a sua desinfecção. c) A minha dentadura será corada, para poder enxergar onde acumula mais biofilme (sujeira) e depois um dos pesquisadores desta pesquisa retirará o corante e o biofilme (sujeira) da minha dentadura e me entregará a minha dentadura. d) Terei que escovar a minha dentadura 3 vezes por dia, durante 21 dias. e) Terei que, antes de dormir, colocar a minha dentadura em um copo contendo água e uma pastilha efervescente (Corega-Tabs®), durante 5 minutos, depois jogarei o que tem dentro do copo fora, e durante a noite, deixarei minha dentadura em um copo contendo água do filtro, farei isto toda noite, durante 21 dias; e) sei que não posso comer, engolir, nem colocar na boca a pastilha ou a água com a pastilha. f) sei que não posso deixar ninguém, nem adulto, nem criança comer, engolir ou colocar essas pastilhas na boca. g)) sei que não posso deixar ninguém, nem adulto, nem criança, beber a água com a pastilha. h) No retorno antes e no retorno após, eu ter feito a limpeza da minha dentadura, como explicado acima, terei que entregar a minha dentadura a um dos pesquisadores, para que possa ser feita a colheita do material da minha dentadura; sendo que a minha dentadura me será devolvida, no mesmo dia, após a colheita. i) a colheita do material da minha dentadura será feita por um dos pesquisadores desta pesquisa, escovando a minha prótese, com escova nova, limpa e usada só para a minha dentadura, e enxaguando a minha dentadura com solução fisiológica (água e sal) esterilizada, sei também que estes procedimentos não causarão risco a minha saúde e nem danos a minha dentadura. j) A minha participação nesta pesquisa será voluntária, e que eu posso, a qualquer momento, me recusar a participar desta pesquisa, sem que eu sofra qualquer penalização. l) A minha identificação pessoal será mantida em segredo. m) Nenhum dos procedimentos descritos acima trará riscos para a minha saúde e nem danos para a minha dentadura. n) Não precisarei pagar para participar desta pesquisa. o) Não receberei dinheiro ou qualquer outra espécie de remuneração para eu participar desta pesquisa. p) Qualquer dúvida que eu tiver, poderá ser esclarecida por um dos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa, durante o desenvolvimento desta pesquisa.

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

Ribeirão Preto,.....de.....de.....

.....

Assinatura do Participante/Sujeito da Pesquisa

.....

Assinatura do Pesquisador Responsável pela Clínica

.....

Assinatura do Coordenador da Pesquisa

APÊNDICE B3. Grupo do ultra-som (Ultrasonic Cleaner®)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO SUJEITO DA PESQUISA

Eu,.....,RG....., assino este **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** com a finalidade de autorizar a minha participação, como sujeito da pesquisa **Avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina, de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, presentes em próteses totais**, desenvolvida sob a responsabilidade de: Profa. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin (RG - 12.688.834-6) e da Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos (RG - 25.065.136-1), e afirmo que me foram dadas todas as explicações necessárias para eu tomar esta decisão de livre e espontânea vontade, como resumida abaixo: Eu sei que: a) Participarão desta pesquisa, pessoas que usam dentaduras. b) Esta pesquisa tem como objetivo avaliar diferentes métodos de limpeza de dentadura, em relação a sua desinfecção. c) A minha dentadura será corada, para poder enxergar onde acumula mais biofilme (sujeira) e depois um dos pesquisadores desta pesquisa retirará o corante e o biofilme (sujeira) da minha dentadura e me entregará a minha dentadura. d) Terei que escovar a minha dentadura 3 vezes por dia, durante 21 dias. e) no meu retorno, um dos pesquisadores desta pesquisa colocará a minha dentadura em cuba de ultra-som contendo água, por 15 minutos. f) No retorno antes e no retorno após, eu ter feito a limpeza da minha dentadura, como explicado acima, terei que entregar a minha dentadura a um dos pesquisadores, para que possa ser feita a colheita do material da minha dentadura; sendo que a minha dentadura me será devolvida, no mesmo dia, após a colheita. g) a colheita do material da minha dentadura será feita por um dos pesquisadores desta pesquisa, escovando a minha prótese, com escova nova, limpa e usada só para a minha dentadura, e enxaguando a minha dentadura com solução fisiológica (água e sal) esterilizada, sei também que estes procedimentos não causarão risco a minha saúde e nem danos a minha dentadura. h) A minha participação nesta pesquisa será voluntária, e que eu posso, a qualquer momento, me recusar a participar desta pesquisa, sem que eu sofra qualquer penalização. i) minha identificação pessoal será mantida em segredo. j) Nenhum dos procedimentos descritos acima trará riscos para a minha saúde e nem danos para a minha dentadura. l) Não precisarei pagar para participar desta pesquisa. m) Não receberei dinheiro ou qualquer outra espécie de remuneração para eu participar desta pesquisa. n) Qualquer dúvida que eu tiver, poderá ser esclarecida por um dos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa, durante o desenvolvimento desta pesquisa.

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

Ribeirão Preto,.....de.....de.....

.....

Assinatura do Participante/Sujeito da Pesquisa

.....

Assinatura do Pesquisador Responsável pela Clínica

.....

Assinatura do Coordenador da Pesquisa

APÊNDICE B4. Grupo das pastilhas efervescentes (Corega Tabs®) associadas ao uso do ultra-som (Ultrasonic Cleaner®)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO SUJEITO DA PESQUISA

Eu,.....,RG....., assino este **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** com a finalidade de autorizar a minha participação, como sujeito da pesquisa **Avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina, de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, presentes em próteses totais**, desenvolvida sob a responsabilidade de: Profa. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin (RG - 12.688.834-6) e da Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos (RG - 25.065.136-1), e afirmo que me foram dadas todas as explicações necessárias para eu tomar esta decisão de livre e espontânea vontade, como resumida abaixo: Eu sei que: a) Participar desta pesquisa, pessoas que usam dentaduras. b) Esta pesquisa tem como objetivo avaliar diferentes métodos de limpeza de dentadura, em relação a sua desinfecção. c) A minha dentadura será corada, para poder enxergar onde acumula mais biofilme (sujeira) e depois um dos pesquisadores desta pesquisa retirará o corante e o biofilme (sujeira) da minha dentadura e me entregará a minha dentadura. d) Terei que escovar a minha dentadura 3 vezes por dia, durante 21 dias. e) Terei que, antes de dormir, colocar a minha dentadura em um copo contendo água e uma pastilha efervescente (Corega-Tabs®), durante 5 minutos, depois jogarei o que tem dentro do copo fora, e durante a noite, deixarei minha dentadura em um copo contendo água do filtro, farei isto toda noite, durante 21 dias; f) sei que não posso comer, engolir, nem colocar na boca a pastilha ou a água com a pastilha. g)) sei que não posso deixar ninguém, nem adulto, nem criança comer, engolir ou colocar essas pastilhas na boca. h)) sei que não posso deixar ninguém, nem adulto, nem criança, beber a água com a pastilha. i) no meu retorno, um dos pesquisadores desta pesquisa colocará a minha dentadura em cuba de ultra-som contendo água, por 15 minutos j) No retorno antes e no retorno após, eu ter feito a limpeza da minha dentadura, como explicado acima, terei que entregar a minha dentadura a um dos pesquisadores, para que possa ser feita a colheita do material da minha dentadura; sendo que a minha dentadura me será devolvida, no mesmo dia, após a colheita. k) a colheita do material da minha dentadura será feita por um dos pesquisadores desta pesquisa, escovando a minha prótese, com escova nova, limpa e usada só para a minha dentadura, e enxaguando a minha dentadura com solução fisiológica (água e sal) esterilizada, sei também que estes procedimentos não causarão risco a minha saúde e nem danos a minha dentadura. l) A minha participação nesta pesquisa será voluntária, e que eu posso, a qualquer momento, me recusar a participar desta pesquisa, sem que eu sofra qualquer penalização. m) A minha identificação pessoal será mantida em segredo. n) Nenhum dos procedimentos descritos acima trará riscos para a minha saúde e nem danos para a minha dentadura. o) Não precisarei pagar para participar desta pesquisa. p) Não receberei dinheiro ou qualquer outra espécie de remuneração para eu participar desta pesquisa. q) Qualquer dúvida que eu tiver, poderá ser esclarecida por um dos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa, durante o desenvolvimento desta pesquisa.

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

Ribeirão Preto,.....de.....de.....

.....

Assinatura do Participante/Sujeito da Pesquisa

.....

Assinatura do Pesquisador Responsável pela Clínica

.....

Assinatura do Coordenador da Pesquisa

ANEXO A: Comitê de ética (número de processo e aprovação)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 602-3970
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 633-0999

CEP/28604/FORP/080904
MLCK/mick

Senhora Professora,

Ref. Processo nº 2003.1.1369.58.4

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 53ª Sessão realizada no dia 03 de setembro de 2004, deliberou aprovar a **prorrogação de mais um ano para entrega dos Relatórios Parcial e Final**, do Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Avaliação das ação antimicrobiana da clorexidina, de pastilhas efervescentes e do ultra-som sobre leveduras do gênero *Candida* e sobre estreptococos do grupo mutans, presentes em próteses totais"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final, ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de apresentar a este Comitê, o Relatório Final no **dia 31 de maio de 2006** e o Relatório Final no **dia 31 de maio de 2007**.

Atenciosamente,

Maria Lúcia Câmara Kühl

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **MARIA CRISTINA MONTEIRO DE SOUZA GUGELMIN**

Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - FCFRP/USP