UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
REABILITAÇÃO ORAL

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA DESINFECÇÃO DE LIGA DE COBALTO-CROMO
POR MEIO DE PASTILHAS HIGIENIZADORAS EFERVESCENTES À BASE
DE PERÓXIDO ALCALINO**

Victor Garone Morelli

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

VICTOR GARONE MORELLI

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA DESINFECÇÃO DE LIGA DE COBALTO-CROMO
POR MEIO DE PASTILHAS HIGIENIZADORAS EFERVESCENTES À BASE
DE PERÓXIDO ALCALINO

Dissertação de Mestrado, apresentada à
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, Departamento
de Materiais Dentários e Prótese.
Área de Concentração: Reabilitação Oral
Versão corrigida.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Morelli, Victor Garone

Avaliação *in vitro* da desinfecção de liga de Cobalto-Cromo por meio de pastilhas higienizadoras efervescentes à base de peróxido alcalino.

Ribeirão Preto, 2016.

110 p.: 22 il.; 30 cm

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

Orientadora: Pagnano, Valéria Oliveira.

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

1. Higienizadores para próteses. 2. Peróxidos alcalinos. 3. Ação antimicrobiana. 4. Liga metálica.

VICTOR GARONE MORELLI

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA DESINFECÇÃO DE LIGA DE COBALTO-CROMO
POR MEIO DE PASTILHAS HIGIENIZADORAS EFERVESCENTES À BASE
DE PERÓXIDO ALCALINO.

Dissertação de Mestrado, apresentada à
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, Departamento
de Materiais Dentários e Prótese.
Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/ 2016

.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus, fonte de toda vida, amor e justiça, Jesus Cristo e toda espiritualidade amiga, que iluminam nossos caminhos, sempre acreditando em tudo que somos capazes, nos fortificando frente aos desafios, comemorando cada passo evolutivo;

A minha esposa Renata, companheira de mais essa etapa, sempre apoiando e incentivando, trazendo serenidade nos momentos necessários, exemplo de pessoa que admiro e amo de alma e coração, sem ela esse o mestrado e esse trabalho não seriam possíveis;

Ao meu pai Cyro (*in memoriam*), que mesmo em outro plano está sempre presente, e minha mãe Sandra, exemplos de amor, carinho e dedicação, por tudo que proporcionaram para meu desenvolvimento, em todos os sentidos, aos quais tenho eterno amor e gratidão;

Aos meus irmãos Cyro e Marcello, pela companhia, respeito, amor e crescimento mútuo;

Ao meu sobrinho Cyro, cunhada Mabel, sogros Edson e Magali, cunhados Carol e Paulo, com os quais passei a compartilhar essa vida e sempre incentivam meus passos;

Aos meus avós, que já não estão nesse plano, mas olham por nós e habitam coração e lembranças;

A todos os familiares, próximos ou distantes, que torcem por nós;

Aos meus filhos caninos, fontes inesgotáveis e infalíveis de amor, alegria e carinho, com os quais também aprendo;

Às amigas firmadas nessa existência;

Dedico essa obra e agradeço a convivência.

Agradecimentos

A todos os contribuintes que, através de seus impostos, também financiam as atividades da FORP USP e bolsas da CAPES, proporcionando a estrutura e condições físicas e de pessoal, necessárias à realização do curso, da pesquisa e dessa dissertação, pois não há dinheiro público que não aquele proveniente dos impostos pagos com o trabalho de todos nós brasileiros.

À Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza, que me recepcionou de portas abertas, por todo suporte na orientação desse trabalho, contribuindo com o desenvolvimento contínuo do senso crítico, profissionalismo, responsabilidade e defesa de pontos de vista. Estimulou o convívio com outros professores do programa e proporcionou relação profissional de aprendizado amplo e mútuo, nas concordâncias ou nas divergências;

À Universidade de São Paulo, que novamente fez parte diária da minha vida, agora na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto que me recebeu de portas abertas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, desde o primeiro contato com a Profa. Dra. Fernanda Panzeri, à época coordenadora do curso de pós-graduação em Reabilitação Oral, e a todos os professores e funcionários deste renomado programa;

Ao amigo Marcos Aricieri Ribeiro, Cel Ribeiro, pela confiança e estímulo em buscar meu ingresso nessa pós-graduação;

Aos professores da Faculdade de Odontologia da USP de São Paulo, Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, Profa. Dra. Dalva Cruz Lagana, Prof. Dr. Roberto Chaib Stegun e Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha, pela confiança e estímulo em buscar meu ingresso nessa pós-graduação;

À amiga Glenda Vasconcelos, colega do curso de mestrado com a qual compartilhei diversas etapas do projeto de pesquisa. Pessoa imprescindível no incentivo e no trabalho de equipe com respeito, aprendizado e ajuda mútua;

Aos demais amigos da turma de mestrado Ana Carolina Roque, Cristian Sbardelotto, Maurício Provinciatti, Mônica Bastos, Rafael Sturaro, Raony Môlin e Régis Eduardo, companheiros de disciplinas, seminários, jornadas e tudo mais que envolve o curso de mestrado, pelo respeito, incentivo e aprendizado mútuos;

A todos os professores da FORP USP que se dedicam ao aprimoramento dos alunos de pós-graduação, representados aqui pela Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis e Profa. Dra. Regina Maura Fernandes, com as quais tive a oportunidade de desenvolver atividades clínicas e de ensino ao longo do curso de mestrado;

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

A todos os técnicos da FORP USP, representados aqui por José de Godói Filho, pela convivência e atenção, realizando com excelência diversas etapas da confecção dos corpos de prova; Luiz Sérgio Soares, o Serginho, incansável no auxílio aos pós-graduandos, desenvolvendo os dispositivos de apreensão dos corpos de prova que foram inestimáveis no processo de polimento; e Odair pela realização do acabamento inicial dos corpos de prova;

À ACECIL pela esterilização dos corpos de prova;

À Viviane de Cássia Oliveira, responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral, que foi fundamental no desenvolvimento da metodologia e experimento com microrganismos;

À Ana Paula Macedo, responsável pelo Laboratório de Metrologia, pelo suporte e participação inestimável nas análises estatísticas;

Às colegas pós-graduandas Patrícia Curylofo e Priscilla Raile, pelo auxílio em parte das etapas laboratoriais, representando também os demais pós-graduandos da FORP USP;

À Ana Paula Xavier, Fernanda Talita de Freitas e Regiane Tirado, secretárias do departamento de Materiais Dentários e Prótese pelo convívio e apoio nas atividades do departamento e tudo que envolve o curso de mestrado;

À Isabel Sola, Mary Carmessano e Regiane Moi, da seção de pós-graduação da FORP USP, pelo auxílio e presteza;

Ao fotógrafo da FORP USP Hermano Teixeira Machado, por diversas fotos desse trabalho;

Aos inúmeros funcionários dos diversos setores da FORP USP, representados aqui por José Ap. Neves do Nascimento, “Seu Zé”, clínica e esterilização, Odair Ananias da Silva, vigilância, Silvia Helena Campos e Daniela Steter Martins, clínica, pelo convívio, auxílio e conversas, pois todos aqueles que vestem a camisa são a força motriz dessa instituição;

Às amigas e Coachs Fabiane Zat e Sandra Schiavetto, fundamentais na reta final dessa dissertação e do futuro que é presente;

Tantas pessoas passam em nossas vidas, algumas continuam ao nosso lado, outras não, mas nada é por acaso e todos trazem um aprendizado; impossível nominar todos que de alguma forma nos ajudaram, por vezes em coisas que parecem pequenas, mas que podem ter valor muito acima de nossa percepção. Por isso, devemos sempre agradecer no momento oportuno, ainda que em silêncio, com o pensamento em Deus. A memória pode falhar, mas não terá importância se sempre agradecermos a tudo que a vida nos proporciona, diariamente;

A todos meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

MORELLI, V.G. **Avaliação *in vitro* da desinfecção de liga de cobalto-cromo por meio de pastilhas higienizadoras efervescentes à base de peróxido alcalino.** 2016. 110 P.

Dissertação de Mestrado em Reabilitação Oral – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A utilização de métodos químicos para higienização de próteses é fundamental para a longevidade do tratamento reabilitador. Entretanto, pouco foi relatado a respeito da ação antimicrobiana das pastilhas efervescentes em estruturas metálicas de Prótese Parcial Removível. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana de 5 higienizadores à base de peróxido alcalino na desinfecção de discos metálicos (12 mm x 3 mm) de Cobalto-Cromo (Co-Cr), obtidos a partir de padrões de cera, confeccionados em matriz metálica. Foram obtidos 252 espécimes de liga de Co-Cr (Degussa), polidos de forma padronizada, divididos aleatoriamente em 24 grupos (n=10) e esterilizados por óxido de etileno. Cada grupo experimental, exceto CN, foi inoculado com: *Candida albicans* (Ca), *Candida glabrata* (Cg), *Streptococcus mutans* (Sm) ou *Staphylococcus aureus* (Sa). A adesão dos microrganismos ocorreu em 1 hora e 30 minutos em estufa incubadora a 37°C. A maturação do biofilme foi obtida em 48 horas, com troca de meio após 24 horas, também a 37°C, sendo que para Sm o processo ocorreu em microaerofilia. Os espécimes contaminados foram imersos por 5 minutos nas soluções: Polident 3 minutos® (P3), Polident for partials® (PP), Efferdent® (EF), Steradent® (ST) e Corega tabs® (CT) e água deionizada estéril (controle positivo, CP). Após as higienizações, os espécimes foram imersos em meio de cultura Lethen broth e levados à cuba ultrassônica para desprendimento dos microrganismos ainda viáveis. As suspensões obtidas foram diluídas, 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , e semeadas para determinação da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). A partir dos valores de UFC foram calculados os valores de $\text{Log}_{10}(\text{UFC}+1)$ para análise estatística. A distribuição dos dados para Ca, Cg e Sa apresentou-se não normal tendo-se utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$), seguido pelo teste de Dunn. Para Sm a distribuição dos dados apresentou-se normal, tendo sido utilizados ANOVA ($\alpha=0,05$) e teste de Tukey. De acordo com os resultados, não houve diferença significativa para Ca em relação ao CP ($p=0,15$). Para Cg ($p=0,00$) houve redução significativa de UFC, com EF e CT, em relação ao CP. Para Sa ($p=0,006$) houve redução significativa de UFC com ST em relação ao CP. Para Sm ($p=0,00$) houve redução significativa de UFC, com PP e ST, em relação ao CP. Conclui-se que, embora alguns higienizadores tenham tido ação antimicrobiana em relação a Cg, Sm e Sa, nenhum foi capaz de reduzir o número de UFC de Ca. Desta forma, os peróxidos alcalinos estudados devem ser utilizados com cautela como agentes de desinfecção de estruturas de Co-Cr, unicamente em imersões de 5 minutos, uma vez que não apresentaram ampla ação antimicrobiana sobre todos os microrganismos avaliados.

Palavras-chave: Higienizadores para próteses, peróxidos alcalinos, ação antimicrobiana, liga metálica.

ABSTRACT

MORELLI, V.G. ***In vitro* evaluation of cobalt-chromium alloy disinfection with alkaline peroxide denture cleansers tablets.** 2016. 110 P.

Master's Degree Dissertation in Oral Rehabilitation – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The use of chemical methods for denture hygiene is essential to the longevity of prosthetic treatment. However, little has been reported about the antimicrobial action of effervescent tablets on metal structures of partial denture. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of 5 alkaline peroxide denture cleansers on disinfection of metal disks (12 mm x 3 mm) made of Cobalt-Chromium (Co-Cr) obtained from wax patterns made up in a metal matrix. There were obtained 252 Co-Cr alloy specimens (Degussa) polished in a standard way, randomly divided into 24 groups ($n = 10$) all of them were sterilized by ethylene oxide. Each experimental group, except CN, was inoculated with: *Candida albicans* (Ca), *Candida glabrata* (Cg), *Streptococcus mutans* (Sm) or *Staphylococcus aureus* (Sa). The adhesion of microorganisms occurred in 1 hour and 30 minutes in an incubator oven at 37°C. The biofilm growth occurred on 48 hours, with medium change every 24 hours, also at 37°C, while Sm process occurred in microaerophilic. Contaminated specimens were immersed for 5 minutes in those solutions: Polident 3 minutes® (P3), Polident for partials® (PP), Efferdent® (EF), Steradent® (ST) and Corega tabs® (CT) and sterile deionized water (positive control, PC). After cleansing the specimens were immersed in the Letheen broth culture medium and taken to the ultrasonic tank to release the still viable microorganisms. The obtained suspensions were diluted, 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} , then seeded to determine the number of Colony Forming Units (CFU / mL). From the CFU values, were calculated values of $\text{Log}_{10}(\text{CFU}+1)$ for statistical analysis. Not-normal distribution of data to Ca, Cg and Sa was observed, it was used Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0.05$) followed by Dunn's posttest. Sm had normal data distribution and was used ANOVA test ($\alpha = 0.05$) and Tukey posttest. Per the results there was no significant difference for Ca ($p = 0.15$). For Cg ($p = 0.00$) significant reduction of CFUs was observed with EF and CT in relation to PC. Sa ($p = 0.006$) had significant reduction of CFUs with ST when compared to CP. For Sm ($p = 0.00$) was observed significant reduction of CFUs with PP and ST in relation to PC. It was concluded that although some denture cleansers had antimicrobial activity against Cg, Sm and Sa, none was able to reduce the CFU number of Ca. Thus, the studied alkaline peroxides should be used with caution as disinfectant agents with Co-Cr structures, solely in 5 minutes of immersion, since they showed no antimicrobial action on all evaluated microorganisms.

Keywords: Denture cleansers, alkaline peroxides, antimicrobial action, dental alloy.

Sumário

1.Introdução	17
2. Revista de Literatura	23
3. Proposição	65
4. Material e Método	67
5. Resultados	85
6. Discussão	95
7. Conclusões	103
8. Referências bibliográficas	105

1. Introdução

A perda de elementos dentais e a necessidade de reabilitação ainda são realidade no dia-a-dia da prática odontológica, apesar de avanços preventivos. Os principais motivos que levam a isso continuam sendo infecções e inflamações decorrentes do acúmulo de biofilme com seus patógenos oportunistas, incluindo doenças periodontais e cáries (Jeyapalan, Krishnan, 2015). Esse acúmulo de biofilme também ocorre nas próteses, com consequências danosas à saúde dos pacientes (Figueiral et al., 2007; Preshaw et al., 2011; Salerno et al., 2011; Li et al., 2012).

Para essas reabilitações, tem ocorrido a crescente indicação dos implantes dentários, devido à sua versatilidade de tratamento; entretanto, nem todos os pacientes podem receber essa indicação. Restrições cirúrgicas, condições de saúde do paciente, financeiras e outras, que contraindicam ou inviabilizam próteses sobre implantes, fazem com que próteses convencionais continuem sendo amplamente indicadas (Budtz-Jørgensen, 1996; Bezzon et al., 2008). Portanto, ainda existe grande indicação de uso de próteses convencionais, especialmente Prótese Parcial Removível (PPR), nos pacientes parcialmente edêntulos.

Uma PPR é composta basicamente de resina acrílica associada a uma estrutura metálica, geralmente de cobalto-cromo (Co-Cr) que pode ser susceptível à adesão e crescimento de microrganismos. Mesmo polidas, as estruturas metálicas são passíveis de adesão e crescimento de *Candida albicans* (Li et al., 2012; Kiesow et al., 2015) e de bactérias aeróbicas e anaeróbicas (McGowan et al., 1988; Kiesow et al., 2015). Segundo a literatura, a resina acrílica também possibilita adesão e crescimento de *Candida* spp (Pellizzaro et al., 2012, Li et al., 2012, Kiesow et al., 2015) e outros microrganismos (Paranhos et al., 2009; Li et al., 2010; Salles et al., 2015).

Muitos autores descrevem a relação de estomatite a usuários de PPR e Prótese Total (PT), denominada normalmente nesses casos de estomatite protética, e também sua relação com higienização deficiente (Dikbas et al., 2006; Uludamar et al., 2010; Salerno et al., 2011; Ercalik-Yalcinkaya, Özcan, 2015). Diversos microrganismos são associados a diferentes patologias bucais e sistêmicas. Na estomatite protética uns dos principais microrganismos

associados são *Candida albicans* e *Candida glabrata*, quando consideradas as leveduras (Figueiral et al., 2007; Salerno et al., 2011; Pellizzaro et al., 2012). A estomatite protética não é causada por um único fator, porém, quanto mais contaminada por *Candida albicans* uma prótese, maior será a intensidade da inflamação associada, pois a higiene oral precária e acúmulo de biofilme na prótese favorecem a virulência desse microrganismo (Salerno et al., 2011), sendo esse acúmulo de biofilme um fator local de predisposição à estomatite protética (Kulak-Ozkan et al., 2002; Salerno et al., 2011; Naik, Pai, 2011).

Sabe-se que a doença cárie está intimamente relacionada com *Streptococcus mutans* que, em usuários de PPR, pode ocorrer especialmente em região radicular, e a saúde periodontal também pode ser afetada por outros microrganismos presentes na PPR (Zlataric et al., 2002; Preshaw et al., 2011). Porém, essas patologias são resultantes da má higienização da PPR com consequente acúmulo de biofilme e microrganismos, e não da PPR por si só (Budtz-Jørgensen, 1996). É importante considerar também que indivíduos saudáveis e com hábitos de higienização satisfatórios também apresentam microrganismos de potencial patogênico inclusive *Candida albicans*, independente da manifestação de sinais clínicos de estomatite protética ou não (Salerno et al., 2011; Duyck et al., 2013). Portanto, a introdução de métodos complementares de higienização pode ser benéfica também a indivíduos saudáveis, ainda que realizem adequada higienização da prótese com métodos tradicionais, pois métodos complementares podem potencializar os resultados (Paranhos et al., 2007; Nishi et al., 2012; Moffa et al., 2016).

Além da preocupação com a higienização das próteses deve-se focar também o cuidado com as questões relacionadas à biossegurança e contaminação cruzada, ou seja, com retornos para ajustes e manutenção das próteses, que são de extrema importância para o profissional da saúde, equipe de apoio, laboratórios de prótese e paciente. Durante a confecção de próteses são diversas idas e vindas de laboratório dos modelos, estruturas e dentes artificiais até a entrega da prótese ao paciente (Powell, 1990; Pavarina et al., 2003; Orsi et al., 2010; Williams et al., 2011). Essas provas e ajustes de prótese, ainda que breves, podem propiciar a contaminação com microrganismos como *Bacillus spp*, *Staphylococcus aureus*, além de outros

estafilococos, pseudomonas e *Candida* spp. (Williams et al., 2011). Desta forma, a necessidade de higienização e desinfecção de estruturas protéticas também é de responsabilidade da equipe de saúde envolvida, que será favorecida com estudos sobre higienização e desinfecção de próteses.

Nikawa et al., em 1999, propuseram uma classificação dos métodos de higienização de prótese, tendo denominado dois grupos principais: mecânico e químico. Nos métodos mecânicos citaram escovação, ultrassom e forno de micro-ondas. Nos métodos químicos, higienizadores e desinfetantes, sendo que os higienizadores comerciais são subdivididos, de acordo com a forma de ação ou composição, em: hipocloritos, peróxidos, peróxidos neutros com enzimas, enzimas, ácidos, drogas cruas e enxaguatórios.

Muitos autores relatam a escovação como método de mais fácil execução e/ou o mais utilizado para higienização de próteses (Uludamar et al., 2010; Peracini et al., 2010; Ercalik-Yalcinkaya, Özcan, 2015; Kiesow et al., 2015). Entretanto, a própria PPR por si só é de difícil higienização e pode favorecer o acúmulo de biofilme (Zlataric et al., 2002; Preshaw, 2011), Como forma de melhorar a limpeza, utiliza-se a associação diária de higienizadores à escovação, que favorece significativamente a redução de microrganismos aderidos à prótese (Paranhos et al., 2007; Nishi et al., 2012; Moffa et al., 2016), uma vez que, a escovação isolada, ainda que com sabão, pasta ou abrasivo, é ineficaz para diminuição de microrganismos (Moffa et al., 2016) e prevenção da estomatite protética, sendo necessário associar métodos químicos à higienização diária (Nikawa et al., 1999).

Deve-se considerar também que os usuários de próteses, especialmente os mais idosos, e também os institucionalizados, podem ter restrições que dificultam a devida higienização das próteses, com especial atenção aos métodos utilizados e suas associações (Hoad-Reddick et al., 1990; Dikbas et al., 2006; Padilha et al., 2007; Uludamar et al., 2011). Desta forma, devem-se associar os métodos químicos de higienização à escovação, envolvendo a imersão em soluções químicas comerciais ou caseiras (Keyf, Güngör, 2003; Paranhos et al., 2007; Peracini et al., 2010; Felipucci et al., 2011a,b; Davi et al., 2012; Kiesow et al., 2015). Ressalta-se que a forma de utilização dessas

substâncias também pode influenciar no resultado (Nikawa et al., 1999; Rossato et al., 2011), por isso a devida eficiência e demais benefícios devem ser continuamente elucidados, sendo necessários mais estudos (Nikawa et al., 1999; de Souza et al., 2009).

Um agente químico comumente utilizado como coadjuvante à escovação na higienização de próteses totais é o hipoclorito de sódio (Pavarina et al., 2003; Pellizzaro et al., 2012; de Sousa Porta et al., 2013; Salles et al., 2015; Kiesow et al., 2015). Contudo, em casos de PPRs, não deve ser utilizado devido ao fato de provocar oxidação de estruturas metálicas (Keyf, Güngör, 2003; Felipucci et al., 2011b; Davi et al., 2012; Kiesow et al., 2015). Além disso, o uso desse produto por curto tempo, pode ser pouco eficaz na redução de biofilme de *Candida albicans*, (Pellizzaro et al., 2012).

Segundo alguns autores, higienizadores à base de peróxido de hidrogênio tendem a não causar danos na superfície dos materiais de uma PPR, dependendo da sua formulação (Felipucci et al., 2011a,b; Davi et al., 2012) ou da forma como é utilizado (Garcia et al., 2004; Kiesow et al., 2015). Em relação à eficiência higienizadora em PPR, em estudo clínico, um higienizador com liberação de peróxido alcalino, promoveu redução geral de microrganismos e diminuição significativa de *Streptococcus mutans*, sem alterar a quantidade de *Candida sp.* (Lucena-Ferreira et al., 2013).

Como já relatado, alguns microrganismos são prevalentes na estomatite protética, sendo a *Candida albicans* o principal e *Candida glabrata* importante microrganismo associado (Kulak-Ozkan et al., 2002; Figueiral et al., 2007; Salerno et al., 2011; Naik, Pai, 2011; Pellizzaro et al., 2012.). Com relação ao *Streptococcus mutans*, além de sua íntima relação com a cárie, suspeita-se interagir com *Candida albicans*, atuando como protetor do seu biofilme (Lucena-Ferreira, 2013). As PPRs também podem apresentar patógenos de importância sistêmica de diversos tipos, tendo íntima relação com a questão de infecção cruzada ou da contaminação do próprio paciente por aspiração, por exemplo, sendo muito comum a presença de *Staphylococcus aureus* (Powell, 1990; Pavarina et al., 2003; Orsi et al., 2010; Uludamar et al., 2010; Williams et al., 2011). Desta forma, a devida ação dos higienizadores sobre esses

microrganismos indicaria indício de atuação favorável à saúde dos usuários de prótese sobre microbiota de importância sistêmica.

Um método de baixo custo, eficaz contra o acúmulo de biofilme, seguro ao paciente e aos materiais que compõem as próteses, seria ideal para higienização e desinfecção de próteses pelo paciente. Preferencialmente deve ser também de rápida execução, prático e ter ação sobre os patógenos oportunistas e associados à estomatite protética e outras patologias bucais associadas às PPR. Entretanto, ainda é evidente que não se alcançou esse método ideal para higienização de PPR, tanto na facilidade como na eficiência, sendo necessários mais estudos (de Souza et al., 2009).

Desta forma, uma vez que a literatura é escassa e inconclusiva sobre a utilização de peróxidos para higienização e desinfecção de PPRs, é importante realizar avaliação desses produtos em relação a parâmetros microbiológicos e estruturas metálicas de PPR. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito antimicrobiano de higienizadores à base de peróxido alcalino, apresentados na forma de pastilhas efervescentes, em biofilmes específicos de microrganismos relacionados à estomatite protética, *Candida albicans* e *Candida glabrata* (Figueiral et al., 2007; Pellizzaro et al., 2012), *Streptococcus mutans*, relacionado à cárie (Zlataric et al., 2002; Preshaw et al., 2011) e *Staphylococcus aureus*, presente em infecções cruzadas e também em algumas patologias orais, estudado por diversos autores (Powell, 1990; Pavarina et al., 2003; Coenye et al., 2008; Uludamar et al., 2010; Orsi et al., 2010; Williams et al., 2011; Salles et al., 2015).

A hipótese nula do trabalho é que a contagem microbiana não seria influenciada pela ação das pastilhas efervescentes avaliadas.

2. Revista de literatura

Moore et al., 1984, verificaram a eficiência de higienizadores de prótese em relação ao biofilme específico de *Candida albicans* in vitro e de bactérias aeróbicas, anaeróbicas e fungos in vivo. Nas duas condições os higienizadores utilizados foram: Denalan® (DE), Efferdent® (EF), Mersene® (ME), Polident Powder® (PP) (Peróxidos alcalinos), Clorox Calgon® (CC) (Hipoclorito alcalino) e Miller's® (MI) (composição desconhecida). Para a etapa in vitro o biofilme de *Candida albicans* foi diluído em água estéril na concentração de 107 UFC/mL, sem corpos de prova, além de grupo controle sem nenhum higienizador. Em 200 mL dessa suspensão fúngica, foi adicionado o higienizador, com $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e o total da concentração recomendada pelos fabricantes. Amostras da solução foram retiradas após 15, 30 e 60 minutos de imersão de cada concentração. Os resultados mostraram redução significativa de biofilme em todos os tempos de imersão e em todas as concentrações com os higienizadores ME, CC e MI, para $\frac{1}{2}$ da concentração recomendada o higienizador EF promoveu redução similar aos higienizadores citados após 60 minutos de imersão, e na concentração total recomendada PP e EF propiciaram redução similar em 30 e 60 minutos de imersão. In vivo, foram avaliados 12 usuários de Prótese Total (PT) e os higienizadores EF, ME, PP, CC e MI, utilizados na etapa in vitro, e também Kleenite® (KL) (Peróxido alcalino), o DE não foi utilizado, pois foi o que apresentou pior resultado in vitro. Também foi utilizada escovação com escova macia associada a sabão e água corrente por 60 segundos. Amostras foram colhidas antes e após os procedimentos para cultura de biofilme aeróbico, anaeróbico e fúngico. Os resultados demonstraram que todos os métodos promoveram redução significativa de microrganismos para bactérias aeróbicas e anaeróbicas, mas para fungos, apenas KL, MI, escovação e ME reduziram significativamente o biofilme.

McGowan et al., 1988, verificaram os efeitos de soluções de hipoclorito, em imersões de curta duração, na superfície de corpos de prova de Co-Cr e Ni-Cr, assim como a capacidade antimicrobiana de biofilme aeróbico e anaeróbico. Foram confeccionados 20 corpos de prova de cada liga. Para o inóculo bacteriano, amostras de mistura de saliva, biofilme e cálculo foram incubadas, de forma a garantir o crescimento de bactérias anaeróbicas e aeróbicas,

isoladamente. Os corpos de prova foram inoculados por microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, e então submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5,25%) em tempos distintos de imersão (5 e 30 minutos) em uma primeira etapa do experimento. Em outra fase foi utilizada apenas a concentração de 5,25% nos tempos de imersão de 1, 3, 5, 10, 15 e 30 minutos e também de 24 horas. Foi feita a verificação de crescimento dos microrganismos, para validar o método, que foi positivo nas duas ligas tanto para anaeróbicos como aeróbicos. As leituras microbianas após imersões ocorreram em 24 horas, 72 horas, 5 dias e 10 dias. Após as imersões, os autores verificaram que apenas amostras de Ni-Cr que ficaram por 24 horas em hipoclorito a 5,25% apresentaram evidência de corrosão, sendo que a liga de Co-Cr utilizada não apresentou evidências de corrosão nem em 24 horas de imersão em hipoclorito a 5,25%. Na imersão de 30 minutos, na mesma solução, houve formação de pequeno precipitado na superfície. Segundo os autores, nenhuma outra alteração visual da superfície foi percebida nos demais grupos. Com relação à parte microbiológica, houve crescimento em todos os espécimes que foram imersos na solução de hipoclorito de sódio a 0,5% após 24 horas. Na concentração de 1% houve crescimento após 24 horas com 5 minutos de imersão. Também houve resultado positivo após 5 dias com 30 minutos de imersão para Co-Cr. Após 10 dias na liga de Ni-Cr, as leituras anteriores foram negativas. Com a concentração de 5,25% também houve crescimento de microrganismos nas imersões de 1 minuto, e nas imersões de 2 minutos na liga de Co-Cr a partir de 5 dias e na liga de Ni-Cr após 10 dias. Os resultados demonstraram que soluções de hipoclorito a 2% por 5 minutos ou a 5,25% por 3 minutos, seriam recomendáveis para desinfecção por imersão de estruturas metálicas sem causar danos, entretanto, imersões de longa duração ou de forma repetitiva, poderiam causar danos às estruturas metálicas.

Hoad-Reddick et al., 1990, publicaram estudo onde avaliaram os métodos de higienização de próteses e o nível de limpeza obtido, dentro de diferentes populações de idosos institucionalizados e não institucionalizados, com e sem cuidados de terceiros. Outras características como idade do paciente, gênero, tempo de uso diário da prótese e idade da prótese também

foram considerados. A maior parte dos pacientes era usuário de PTs bimaxilares, sendo que de 223 pacientes examinados apenas 9 eram usuários de próteses parciais removíveis (PPRs). Dos pacientes avaliados, 86,3% relataram não terem sido orientados quanto à higienização pelo dentista ou sua equipe. O método de higienização considerado ideal pelos autores, escovação associada à imersão, era utilizado pela maioria dos pacientes não institucionalizados, mas apenas de 22% a 26% dos institucionalizados tinham suas próteses higienizadas por essa associação de métodos. A higienização diária, independentemente do método, era realizada em 79% dos avaliados. A imersão das próteses foi relatada por 27,9% daqueles com próteses consideradas limpas e em 15,8% daqueles com as consideradas com higienização insatisfatória. O uso de algum higienizador foi relatado por 71,7% dos usuários de próteses devidamente higienizadas e por 55,8% dos usuários com próteses de higiene insatisfatória, e que usavam o higienizador diariamente 90,2% e 76,6%, respectivamente. Foi verificada a incidência de estomatite protética em dobro nos usuários de próteses mal higienizadas. Os autores concluíram que apenas 40% das próteses avaliadas foram consideradas com níveis satisfatórios de higienização e que as corretas orientações deveriam ser enfatizadas pelos dentistas e suas equipes, pela mídia e também fabricantes de produtos higienizadores.

Powell et al., 1990, publicaram estudo onde verificaram a presença e identificação de microrganismos em moldes, modelos e estruturas de próteses enviados aos laboratórios pelos cirurgiões-dentistas. Relataram que estudos prévios confirmaram a transmissão e atividade de microrganismos entre moldes, modelos, próteses e pontas de polimento, mas sem identificação dos microrganismos. Os autores escolheram laboratórios de 4 regiões geográficas diferentes dos EUA. Em todos eles as próteses, moldes e coroas foram submetidos à coleta e cultura de amostras, antes de qualquer tipo de processo higienizador realizado no laboratório. Foram realizadas culturas distintas em busca de bactérias ou vírus, sendo para bactérias utilizado um período de 12 horas e vírus de 24 horas. Os autores verificaram contaminação bacteriana em 67% das amostras, entre eles *Streptococcus* sp e *Staphylococcus* sp, mas não observaram crescimento de vírus, o que consideraram não ser conclusivo

quanto à inexistência desse tipo de microrganismo. Concluíram que mais estudos seriam necessários sobre contaminação cruzada, especialmente sobre vírus.

Drake et al., 1992, publicaram estudo onde desenvolveram um novo modelo in vitro de colonização por bactéria e levedura, em Prótese Total, para verificar a eficácia antimicrobiana de higienizadores de Prótese Total, em microrganismos relacionados à estomatite protética. Para isso utilizaram recortes retangulares (15 mm x 25 mm) de base de prova de resina acrílica termopolimerizada, com 2 a 3 mm de espessura, obtida a partir de modelos de maxila. Os microrganismos estudados foram *C. albicans* e *S. mutans*. Para contaminação dos corpos de prova, duas formas de incubação foram utilizadas, uma com solução salina (PBS) e outra com saliva, e os higienizadores estudados foram Super-Strenght Polident® e Professional-Strength Efferdent®, além de um controle sem higienizador, imerso apenas em água. Individualmente cada corpo de prova, tanto da incubação dos microrganismos com PBS como com saliva, foram submetidos então à imersão com higienizador específico, pelo tempo de 12 minutos, em um béquer com 100 mL de água a 45°C. O estudo buscou fornecer dois resultados, a influência da película salivar na colonização dos microrganismos e o efeito antimicrobiano dos higienizadores. Para isso utilizaram leituras de UFC e análise estatística do valor de Log10. Na colonização dos corpos de prova observaram que a saliva ou PBS apresentaram valores sem diferenças significativas. Nos resultados dos higienizadores observaram, tanto para Polident® como para Efferdent®, redução significativa de *S. mutans*, mas sem reduções significativas para *C. albicans*. Frente a esse resultado fizeram um experimento extra, onde incubaram *C. albicans* em PBS, sem corpo de prova, em duas amostras de 50 mL e confirmaram o mesmo nível de UFC em ambas. Uma delas serviu de controle e na outra foi colocado uma pastilha de Efferdent®, que demonstrou o melhor resultado de redução de *S. mutans*. Dessa forma conseguiram a eliminação do microrganismo, obtendo leitura zero de UFC. Outro teste realizado foi um pré-tratamento dos corpos de prova com Efferdent®, antes da contaminação, mas isso não alterou o nível de colonização dos corpos de prova. Os autores concluíram que tanto Polident® quanto Efferdent® foram

eficientes na redução significativa de *S. mutans*, mas foram ineficientes na redução de *C. albicans*.

Nikawa et al., 1995, publicaram estudo onde verificaram a eficiência na redução de *C. albicans* por higienizadores comerciais. Utilizaram corpos de prova de resina acrílica de forma quadrangular (50 mm x 0,7 mm) e 11 higienizadores comerciais: Steradent® (SD) (peróxido alcalino), Doctor health® (DH), Dent Free® (DF), Nisodent® (ND), Polident® (PD), Liodent® (LD) (peróxidos neutros com enzimas), Clean Soft® (CS), Pika DCE® (PK), Plakick® (PL) (enzimas), Spa Dent® (Spa) (droga crua) e emuCAE® (CAE) (desinfetante). Os corpos de prova foram primeiro submetidos a um recobrimento de saliva para depois serem incubados com *C. albicans* por 2 horas de aderência e 144 horas de crescimento. Os higienizadores foram dissolvidos ou diluídos, conforme sua apresentação, em 200 mL de água destilada estéril e o tempo de ação foi de 2 horas a temperatura ambiente. Dois tipos de leitura foram feitas para os resultados, contagem de UFC para verificar efeito fungicida, contagem total de células com hemocítômetro (câmara de Neubauer) para verificar o efeito lítico e análise de pH para verificar a atividade do biofilme remanescente. Os resultados mostraram que em relação ao efeito fungicida não verificaram células viáveis para nenhum dos tipos de peróxidos estudados, CS, PK (enzimas) e CAE (desinfetante). O efeito lítico foi observado apenas para o PK (enzima). Já no efeito sobre a atividade do biofilme, foi observada a maior redução com DF (peróxido neutro com enzimas) e com os demais higienizadores, em ordem decrescente de redução de atividade, CAE (desinfetante), SD (peróxido alcalino), CS (enzimas), ND, LD, DH e PD (peróxidos neutros com enzimas), e os demais higienizadores não apresentaram redução significativa na atividade do biofilme. Concluíram que o método de leitura de pH é eficiente para definir a atividade do biofilme, que apenas um higienizador enzimático (PK) promoveu efeito lítico no microrganismo, que a habilidade dos higienizadores em reduzir o biofilme foi similar aos efeitos fungicidas, sendo que as leveduras em biofilme apresentam maior resistência aos higienizadores, e que peróxidos, desinfetante e o enzimático CS foram os que reduziram a atividade do biofilme.

Budtz-Jørgensen, 1996, realizou revisão bibliográfica sobre opções de reabilitação de pacientes parcialmente edêntulos, comparando overdenture, Prótese Parcial Removível (PPR), Prótese Parcial Fixa (PPF) e implantes. Em relação à PPR ressaltou vantagens como baixo custo, conservadora e que a devida higiene não acarreta problemas periodontais, mas que retornos regulares e manutenções são necessários. Relatou também que os demais tipos de prótese exigem retornos e manutenções, mas em relação à PPF, tende a possuir vantagens estéticas e de adaptação do paciente, porém com maior custo e necessita de condições clínicas mais específicas. A overdenture é indicada como alternativa de escolha para PT, onde os dentes remanescentes não são favoráveis nem para PPF nem para PPR. O autor salientou que, nesse caso, poderia se optar pelos implantes também, mas com um custo bem mais elevado. Em geral, as PPFs têm custo mais elevado que as PPRs, além de serem mais invasivas, causando desgastes irreversíveis nos dentes, e, muitas vezes, necessitarem de tratamento endodôntico dos pilares. A maior complexidade técnica tanto da sua confecção em si quanto dos procedimentos associados, como endodontia, são fatores adicionais de complicações e modificações futuras. A inserção óssea dos pilares de PPF também é mais crítica que na PPR, especialmente quando se considera realizar PPF de curto cantilever distal de um pré-molar. Implantes são considerados ótima opção para reabilitação do paciente parcialmente edêntulo, entretanto, os melhores resultados e prognósticos são obtidos com 3 ou mais implantes do que apenas dois, dessa forma sendo ainda maior o custo e necessidade de suporte ósseo. Para a escolha do tratamento, sempre deve se levar em conta o impacto biológico de cada tratamento e como se obter a melhor manutenção de higiene de cada um, fator relacionado diretamente com a motivação do paciente. Ressaltou que overdenture sobre dentes não deve ser considerada se for possível PPF ou PPR, pois tende a agravar quadros periodontais e proporcionar maior incidência de cáries que as outras próteses. Concluiu que a escolha do tratamento protético deve ser feito de acordo com as condições de saúde oral e sistêmica do paciente, grau de cooperação, questões financeiras, qualidade biológica e técnica dos materiais envolvidos, além do conhecimento e domínio de técnicas do profissional.

Nikawa et al., 1999, publicaram revisão de literatura onde avaliaram os métodos utilizados nos estudos in vitro e in vivo sobre higienização de próteses. Em relação aos métodos de higienização estudados, classificaram em dois grupos principais: mecânico e químico. Nos métodos mecânicos citaram escovação, ultrassom e forno de micro-ondas, ressaltando que a escovação, associada ou não a algum sabão, abrasivo ou dentífrico, é a forma mais utilizada de higienização, e que, ainda, utilizar água morna na escovação é um hábito comum. Relataram que escovação isolada não é eficaz para redução de microrganismos ou na prevenção da estomatite protética, sugerindo complementação química. Nos métodos químicos citaram dois grupos principais: higienizadores e desinfetantes. Os higienizadores comerciais são então subdivididos, de acordo com a forma de ação ou composição, em: hipocloritos, peróxidos, peróxidos neutros com enzimas, enzimas, ácidos, drogas cruas e enxaguatórios. Em relação aos métodos de estudos utilizados, salientaram que os métodos in vitro, apesar de questionável a extrapolação do resultado para situações clínicas, são de grande importância para comparações sobre a eficácia e forma de ação de cada higienizador frente ao(s) microrganismo(s) estudados. Afirmaram, a partir dos artigos considerados, que apenas *C. albicans* e *S. mutans* foram utilizados para formação de biofilme, o primeiro pela direta relação com estomatite protética e o segundo pela relação com a cárie. Relataram que os estudos in vivo, apesar de trazerem uma ideia de maior fidelidade dos resultados, também são passivos de mais erros e dificuldade de padronização dos métodos utilizados. Para os devidos subsídios na formulação de metodologia, ressaltaram a importância da devida fase de aderência e crescimento dos microrganismos na formação de um biofilme efetivo, e que o crescimento deveria ser de no mínimo 16 horas. Sugeriram tempo de ação dos higienizadores de 10 a 15 minutos, com diluição em água a 40/50°C. Concluíram que, as discrepâncias nos resultados dos estudos poderiam estar relacionadas à falta de padronização das metodologias e ressaltaram a importância da continuidade dos estudos de eficácia de higienizadores tanto in vitro quanto in vivo, para avaliar não apenas o biofilme residual, mas também a capacidade de inibir o crescimento do microrganismo pós higienização e standardizar os materiais e métodos de avaliação.

Kulak-Ozkan et al., 2002, verificaram os hábitos de higiene, nível de higienização nas próteses, presença de fungos e de estomatite em uma população idosa de 70 pacientes usuários de PT. Realizaram exames clínicos para definir o nível de inflamação e presença da estomatite, assim como coleta nas PTs para verificação de crescimento de fungos. Os resultados mostraram ausência de crescimento de fungos em 61,4% das próteses, nas outras 38,6% que apresentaram crescimento, houve prevalência de *C. albicans* em 21,4%, mas também foram encontradas *C. tropicalis* (8,5%), *C. Krusei* (2,9%), *C. quilliermondii* (2,9%) e *C. parapsilosis* (2,9%). O nível de higienização foi considerado excelente em 15,7% das próteses, mediano em 35,7% e precário em 48,6%. Quanto aos hábitos de higienização, 25,7% realizavam higienização menos de 1 vez ao dia em média, 28,6% uma vez ao dia e 45,7% mais de uma vez ao dia. Quanto ao método, 57,1% utilizavam apenas escovação, 5,7% imersão em alguma substância, 17,1% realizavam imersão em água e 8,6% associavam escovação e imersão, sendo que 11,5% não citaram nenhuma forma de higienizar as próteses. Em relação aos fungos, 100% daqueles que apresentaram estomatite generalizada apresentaram esse tipo de microrganismo identificado nas próteses, dos que apresentavam a estomatite na forma localizada, 37,5% apresentaram fungos e daqueles sem evidências de estomatite, 15,3% também continham fungos na prótese. A relação com a má higienização e estomatite protética também foi identificada de forma significativa, o que não ocorreu em relação à frequência de higienização. Concluíram que houve relação significativa da estomatite protética com fungos, especialmente em níveis generalizados, e também com a má higiene. Ressaltaram que a dificuldade motora dos idosos prejudica ainda mais a devida higienização das próteses.

Zlataric et al., 2002, verificaram os efeitos das PPRs na saúde periodontal dos dentes pilares e não pilares em 205 usuários de PPR. A pesquisa foi dividida em duas etapas. Na primeira foi elaborado um questionário referente a idade, gênero, tempo de uso de prótese, observações sobre acúmulo de alimento nas regiões das próteses e dentes remanescentes, hábitos de fumo, uso das próteses e hálito. Na outra etapa foram realizados exames para se obter dados sobre classificação de Kennedy, materiais das

próteses, tipo de suporte protético, desenho da base da prótese, dentes em contato, número de grampos existentes, apoios oclusais, índice de placa (IP), índice gengival (IG), índice de cálculo (IC), índice de Tarbet (IT), profundidade de sondagem (PS), recessão gengival (RG) e mobilidade dental (MD). Os dados e a análise estatística demonstraram diferenças significativas entre dentes pilares e não pilares para os itens IP, IC, IG, PS, MD e RG, sendo que os dentes pilares apresentavam piores condições de saúde periodontal. Os autores concluíram que as PPRs afetam a saúde periodontal dos dentes pilares, sendo que o desenho da prótese também influencia, onde suas estruturas devem ficar o mais distante possível das margens gengivais. Assim como o desenho correto, adequada higienização também reduz os efeitos deletérios das PPRs sobre a saúde periodontal dos dentes pilares.

Pavarina et al., 2003, analisaram diferentes protocolos de desinfecção de próteses por imersão em soluções desinfetantes. 32 usuários de prótese removível bimaxilar, total e/ou parcial, foram avaliados, apresentando um total de 64 próteses em uso a pelo menos 6 meses. As amostras iniciais foram obtidas das próteses e imediatamente colocadas em meio de cultura para incubação por 24 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Antes dos procedimentos de desinfecção, todas as próteses foram escovadas com clorexidina a 4% e enxaguadas em água estéril por 1 minuto e divididas em 4 grupos de 8 próteses bimaxilares, para, então, serem imersas por 10 minutos em 200 mL de cada solução higienizadora. As soluções avaliadas foram: Gluconato de clorexidina a 4%, Hipoclorito de sódio a 1%, solução a 0,48% de Biocide (iodóforo) ou solução a 3,78% de Amosan (peróxido alcalino). Após esse período foram imersas em outros sacos com 200 mL de água estéril por 3 minutos para remoção de resíduos das soluções. Para verificação da efetividade com ultrassom, parte das amostras (próteses maxilares) foi levada ao ultrassom, e a outra parte (próteses mandibulares) não. Exceto para o Biocide, independente do ultrassom, as soluções promoveram níveis de redução significativos no crescimento dos microrganismos. Os autores concluíram que, após escovação com clorexidina a 4%, a imersão por 10 minutos em 200 mL de Gluconato de clorexidina a 4%, Hipoclorito de sódio a 1% ou solução a 3,78% de Amosan (peróxido alcalino) podem promover redução significativa no crescimento de

microrganismos, diminuindo riscos de contaminação cruzada do paciente para a equipe odontológica e para outros pacientes.

Keyf e Güngör, 2003, avaliaram os efeitos da imersão de liga metálica de Co-Cr em diferentes soluções: hipoclorito comercial (Axion), pastilha higienizadora (Corega Tabs) e controle em água morna, todos em um mesmo volume de 200 mL. Foram simuladas imersões diárias de 30 minutos por 30 dias. A avaliação dos efeitos foi realizada a partir de espectrofotômetro, em dois comprimentos de onda, e por meio do peso dos corpos de prova, com leituras obtidas antes e após os períodos de imersão. As medidas de peso não demonstraram alterações em nenhum grupo. Já a reflexão da superfície avaliada no espectrofotômetro apresentou redução significativa sob ação do hipoclorito e da pastilha higienizadora. Houve redução da reflexão também no grupo de água morna, mas não foi estatisticamente significativa. O grupo do hipoclorito também apresentou uma superfície visualmente mais afetada que do grupo de pastilha higienizadora, devido ao efeito corrosivo do hipoclorito. Os autores concluíram que soluções higienizadoras alteraram a superfície da liga avaliada, que o hipoclorito é mais agressivo do que a pastilha higienizadora, que não houve alterações de peso e que a pastilha higienizadora também apresenta a vantagem de ser mais fácil e rápida de ser utilizada do que o hipoclorito.

Garcia et al., 2004, realizaram estudo para verificar a influência de dois higienizadores na rugosidade superficial de uma resina acrílica e duas ligas metálicas, Co-Cr e Ti-6Al-4V, além da avaliação da dureza superficial da resina. Utilizaram o higienizador comercial Polident® contendo perborato de sódio, monopersulfato de potássio, enzima proteolítica, detergente e base efervescente, e um higienizador de farmácia de manipulação da Fórmula & Ação (Brasil) contendo perborato de sódio, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio e ácido tartárico. Os corpos de prova eram imersos em saliva artificial, o que proporcionava uma película adquirida, por 5 horas e depois eram imersos em 200 mL de água morna com o higienizador dissolvido por 5 minutos. Após isso eram lavados em água corrente por 10 segundos e novamente colocados na saliva artificial por 5 horas. Esse processo foi realizado de forma consecutiva, simulando 3 imersões diárias por até 30 dias, e as leituras

realizadas foram iniciais (T0), após a primeira imersão (T1) e após 15 (T15) e 30 dias (T30). Houve também um grupo controle para cada material que era imerso apenas em água morna, pelo mesmo tempo dos demais e que passava pelos mesmos procedimentos de saliva artificial. Os resultados mostraram alterações de dureza e rugosidade nos grupos da água (controle) e do higienizador manipulado, porém sem diferenças significativas no grupo imerso em Polident®. Os autores consideraram que as alterações observadas ocorreram pela incapacidade de remoção da película adquirida da água e do higienizador manipulado, pois apresentou pequena liberação de oxigênio do perborato de sódio, e não teve efervescência como o Polident®, que liberou quantidade maior de oxigênio, o que poderia ser responsável pela remoção da película adquirida. Observaram ainda que a liga de ti-6Al-4V, apresentou menor formação da película que o Co-Cr. Concluíram que o higienizador com perborato de sódio e sem peróxido de hidrogênio foi ineficiente na remoção de película adquirida, quando comparado com grupos controles imersos apenas na água. Desta forma, afirmaram que a presença do peróxido de hidrogênio proporcionou maior capacidade de remoção da película e maior poder higienizador, sem afetar a dureza ou rugosidade dos materiais estudados. Essa incapacidade de remover a película é o que pode ter levado ao aumento da dureza e rugosidade observadas no grupo imerso no higienizador manipulado.

Dikbas et al., 2006, realizaram estudo para avaliar o nível e hábitos de higiene de usuários de diversos tipos de próteses removíveis, parciais e totais. Os autores ressaltaram a importância dos hábitos e frequência de higienização para melhor prognóstico e longevidade desses tipos de próteses. Foram avaliados 234 pacientes para confecção de novas próteses. As condições de higiene foram avaliadas e questionários aplicados para identificar os hábitos de higiene e a frequência. Os resultados mostraram que 70 usuários utilizavam próteses com até 5 anos de uso, 86 usavam entre 6 a 10 anos, 75 de 11 a 30 anos e apenas 3 acima de 31 anos. Ainda, 52,9% colocavam suas próteses apenas durante o dia, 41,5% utilizam também à noite, e 5,6% apenas para alimentação ou motivos sociais. Nos métodos de higienização, a escovação com dentífrico era a preferida por 40,59% dos avaliados. Dos que utilizavam a imersão, um utilizava enxaguatório bucal, 3 utilizavam pastilhas higienizadoras

e 10, solução caseira contendo hipoclorito. Quanto à associação de métodos 89 pacientes relataram que utilizavam escovação de forma regular e imersão de forma eventual, destes 25 utilizavam as pastilhas higienizadoras, que representavam então 11,9% dos métodos de imersão utilizados. A higienização diária foi observada em 70% das respostas, sendo 2 a 3 vezes na semana a frequência de 10,3%, apenas uma vez na semana representava 13,2% e, ainda, 6,4% disseram não recordar a frequência. Dos que higienizavam diariamente, 42,7% uma vez ao dia, 32,3% duas vezes ao dia e 25% três vezes ao dia. As avaliações clínicas revelaram que apenas 11,9% das próteses foram consideradas limpas, 47,5% foram consideradas precárias e 40,6% muito precárias. Os autores observaram também relação significativa entre as próteses limpas e pacientes que foram orientados sobre higienização pelo profissional que realizou a prótese. Em relação à estomatite protética, foi observada em 55,5% dos pacientes, com relação significativa de maior incidência com tempo de instalação da prótese, assim como com pior higienização. Os autores afirmaram que existe relação direta significativa entre a idade da prótese e nível de higienização, quanto maior o tempo de uso, pior a higienização. A frequência de higienização pareceu não interferir na incidência de estomatite protética. Os autores concluíram que existe grande deficiência na higienização de próteses do grupo estudado, com relação direta com a incidência de estomatite protética. Afirmaram que o cirurgião-dentista tem o dever de instruir devidamente o paciente, sendo este último, de fato, responsável pela higienização. Além disso, ressaltaram que o cirurgião-dentista deve estar atento aos meios e métodos disponíveis para esse fim.

Paranhos et al., 2007, avaliaram in vivo a eficiência, na remoção de biofilme, de diferentes métodos de higienização de prótese de 36 usuários de PT. Todos realizaram 6 diferentes métodos de higienização, um método por semana. Os métodos consistiam em: 1- Enxague com água após as refeições (café, almoço e jantar) como controle; 2- Enxague da prótese após café e almoço e imersão da prótese, por 5 minutos, em solução de peróxido alcalino (Bonyplus®) após o jantar, enxágue antes de utilizar a prótese novamente; 3 – Escovação por 2 minutos, com 2 cm de pasta (Dentu Creme®) e escova (Johnson e Johnson's® escova macia) após as refeições, com imersão em

água no período noturno; 4 – Associação entre métodos 2 e 3; 5 – igual ao método 3 porém com a escova Oral B® macia número 40; 6 – Associação dos métodos 2 e 5. Para avaliar o biofilme utilizaram uma solução corante na superfície interna das próteses maxilares, para então fotografar de forma padronizada, obtendo imagens digitais que foram comparadas em software. Os resultados mostraram que todos os métodos apresentaram, significativamente, menor presença de biofilme que o controle (método 1). Porém, todos os métodos com escovação, com ou sem o higienizador, apresentaram quantidade de biofilme significativamente menor que apenas a imersão (método 2). Os autores concluíram que somente o enxague da prótese propiciou maior acúmulo de biofilme, que a escovação foi mais eficiente na remoção do biofilme que a simples imersão em peróxido alcalino, mas que associação de escovação e esse tipo de imersão pode melhorar os resultados. Verificaram que as regiões retentivas são as que mais acumulam biofilme, independentemente do método de higienização, necessitando de maior atenção nessas regiões. A escovação isolada e a associação a um peróxido alcalino constituem métodos eficazes de higienização de próteses.

Figueiral et al., 2007, publicaram um estudo onde acompanharam 140 usuários de prótese removível para verificar presença de estomatite protética e quais seriam os microrganismos associados. Foram selecionados 70 pacientes com estomatite protética e outros 70 sem essa patologia. Alguns dados da pesquisa foram obtidos de várias formas, como questionários, histórico de hábitos e exames clínicos. Depois, amostras microbiológicas obtidas da mucosa do palato duro, superfície de contato da prótese e da saliva, foram utilizadas para se obterem leveduras, em meio específico e contagem de UFC. A partir de toda essa coleta de dados e análise estatística, os resultados obtidos indicaram prevalência da estomatite protética em 45,3% dos pacientes. Além de relações com diversos fatores de hábitos, idade, sexo e outros aspectos clínicos, observaram que quanto maior o tempo de uso da prótese também maior a prevalência da estomatite protética, assim como a idade da prótese, quanto mais velha, maior a prevalência. Quanto à prevalência de leveduras em relação à saliva, independente da presença de estomatite protética, verificaram prevalência significativa de leveduras em indivíduos com

hipossalivação e pH baixo. Em relação ao tipo de levedura encontraram prevalência de *C. albicans* nos portadores da estomatite protética em relação ao grupo sem a patologia (81,4% x 27,2%). Interessante ressaltar também que *C. glabrata* não foi encontrada em indivíduos sem a estomatite protética, porém surgiu de forma isolada em 7,1% dos portadores. Nesses indivíduos também foi localizada a *C. tropicalis*, porém, sempre associada a *C. albicans*, *C. glabrata* ou ambas. Os indivíduos sem estomatite protética apresentaram, além da *C. albicans* e *C. tropicalis*, isoladas ou associadas, outras cepas de *Candida* não encontradas nos indivíduos portadores da estomatite protética. Os autores concluíram que existe prevalência de estomatite protética em 45,3% da população estudada, que mulheres são mais suscetíveis, mas pessoas mais idosas, ou que consomem maior quantidade de álcool, não são mais suscetíveis. Afirmaram ainda que alguns aspectos como tempo de utilização da prótese, dimensão vertical reduzida, oclusão instável e uso contínuo da prótese favorecem a estomatite protética, mas ressaltaram um aspecto de característica traumática na etiologia. Para a questão microbiológica, na etiologia da estomatite protética, as leveduras, especialmente *C. albicans*, afirmaram estar associadas ao desenvolvimento da doença.

Padilha et al., 2007, frente ao alto índice de lesões e inflamações na mucosa oral da população idosa no Brasil, publicaram estudo sobre uma população institucionalizada, constituída por 49 pacientes para verificar relação do nível de redução das habilidades manuais com o acúmulo de biofilme em próteses e dentes remanescentes desses pacientes, sendo que 29 tinham pelo menos um dente e 36 utilizavam pelo menos uma PT. Consideraram também questões como gênero, idade e capacidade cognitiva. Após a seleção dos participantes, exames de coordenação e habilidade motora foram aplicados para dividir, conforme esse quesito, em dois grupos, um de maior habilidade e outro de menor habilidade, além da medição da capacidade cognitiva. Para avaliação do nível de higiene dos dentes e próteses, os pacientes foram orientados a realizar a higienização habitual imediatamente antes das avaliações. As avaliações dos níveis de higienização foram feitas apenas nas próteses totais. Os autores verificaram redução significativa do nível de higienização no grupo de menor habilidade manual, tanto nos dentes como nas

próteses, que está de acordo com a literatura. Fatores como idade e sexo não tiveram relação estatística com essa redução.

Coenye et al., 2008, verificaram a ação de higienizadores sobre cepas de *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para isso utilizaram corpos de prova circulares (6,8 mm de diâmetro x 2 mm de espessura) de resina acrílica (polimetil metacrilato), silicone e hidroxiapatita. Os higienizadores testados foram Nitradine®, Polident®, Steradent® e Efferdent®, conforme instruções do fabricante, sendo 150 mL de água morna para Nitradine® por 15 minutos, os demais em 200 mL de água morna por 5 minutos. O crescimento dos microrganismos ocorreu em um dispositivo apropriado denominado Dispositivo de Robbins modificado, que conferiu fluxo contínuo de meio de cultura a 36 corpos de prova por microrganismo, após adesão de 1 hora e para um crescimento de 48 horas. A partir dos resultados, os autores verificaram eficiência significativa na redução de biofilme, a partir da contagem de UFC, pelo Nitradine® em todos os microrganismos, porém houve considerável redução na eficiência contra *S. mutans* em hidroxiapatita. Os demais higienizadores não apresentaram a mesma eficiência, e os autores consideraram que foram bem menos eficientes na remoção dos biofilmes na resina acrílica, onde o Steradent® não teria causado nenhuma redução e Polident® e Efferdent® reduções não significativas.

Bezzon et al., 2008, relataram um caso clínico onde o paciente já era portador de próteses fixas (PPFs), que, no entanto, teve fratura de pilares, onde foram indicadas exodontias e confecção de novas próteses. Inicialmente foi realizada uma prótese parcial removível (PPR) provisória. A avaliação e planejamento do caso apresentavam condições extremamente favoráveis à reabilitação com implantes, tanto nas condições bucais quanto sistêmicas. O plano de tratamento foi apresentado à paciente, que não aceitou a opção de implantes. Outras opções foram consideradas e apresentadas, e a paciente optou pela reabilitação com PPR associada à PPF a nos pilares. Apesar de não ser o tratamento de escolha dos autores, a PPR proporcionou função e estética satisfatória, acima das expectativas da paciente. Os autores concluíram que esse caso ilustra bem situações onde o profissional deve estar preparado para

realizar tratamentos alternativos à primeira opção por questões que não se pode controlar, como a vontade do paciente.

Paranhos et al., 2009, realizaram estudo para verificar o efeito de três diferentes métodos de higienização sobre diversos microrganismos. Os métodos avaliados foram: imersão química em um peróxido alcalino (Bonyplus tablets®) por 5 minutos, escovação com dentífrício (Dentu Creme) por 20 segundos e associação dos dois métodos anteriores. Utilizaram espécimes de resina acrílica em forma de disco (15 mm x por 4 mm) que foram contaminados com microrganismos de cepas padronizadas de *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, e cepas de campo de *S. mutans*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Para cada microrganismo utilizaram n=5 em cada método de higienização, além de controles positivos que eram apenas imersos em água. Os grupos de higienização química eram imersos em 200 mL de água destilada a 37°C estéril, onde uma pastilha higienizadora era dissolvida. Nos grupos de escovação cada espécime foi escovado em todas as faces por uma escova nova e estéril, por 20 segundos, com dentífrício específico para próteses, e depois imerso por 5 minutos em água destilada esterilizada. No grupo da associação de métodos, primeiro ocorria a escovação, seguida da imersão, conforme descrito. Para avaliar a eficiência dos métodos, os autores utilizaram as contagens de UFC para cada microrganismo, com crescimento de 48 horas. Os resultados mostraram que não houve diferenças entre os métodos utilizados para os microrganismos *S. aureus*, *S. mutans* (cepas padrão e campo) e *P. aeruginosa*. Para os microrganismos *E. faecalis*, *C. albicans* (cepas padrão e campo) e *C. glabrata* os métodos mecânicos e associados mostraram similaridade e superioridade ao método químico e para *E. coli* e *C. tropicalis*, o método de associação mostrou-se superior ao químico, sendo o método mecânico intermediário aos outros dois. Os autores concluíram que os métodos avaliados demonstraram resultados que variam de acordo com o tipo de microrganismo, mas que, em geral a associação da escovação com imersão química foi similar ao método de escovação, e, muitas vezes, superior ao método químico.

Uma revisão sistemática sobre métodos de higienização utilizados para próteses removíveis foi realizada por de Souza et al., 2009, com objetivo

de verificar a efetividade e segurança dos métodos. Os autores ressaltaram que escovação e imersão em soluções químicas são os métodos mais utilizados. Para isso utilizaram artigos que fossem estudos randomizados, relativos a PTs ou PPRs e que comparassem pelo menos um método mecânico, como escovação ou ultrassom, com um método de imersão em solução química, como peróxidos, ácidos, enzimas ou hipocloritos. Possíveis vieses experimentais também foram levados em consideração. Apenas 6 artigos se encaixaram nos critérios estabelecidos, ainda assim, considerados de alto risco de viés experimental. Outro fator que surpreendeu os autores foi que, na análise dos trabalhos, observaram a eficiência superior de soluções enzimáticas em relação aos peróxidos efervescentes, especialmente nos períodos de 8 horas, mas que haveria similaridade nos períodos curtos de 15 minutos na remoção de biofilme. Relataram também que a escovação se assemelha às enzimas e é superior aos peróxidos efervescentes na remoção de biofilme de PTs. Para contagem microbiana verificaram similaridade entre os diversos métodos de imersão. Também verificaram estudos que acharam similaridade na redução de microrganismos diversos, aeróbicos, anaeróbicos e leveduras, comparando escovação e imersões. Desses estudos, um demonstrou maior eficiência do higienizador, no caso um peróxido efervescente. Os autores destacaram que o estudo avaliava apenas a quantidade total de microrganismos anaeróbios e de *Fusobacterium* spp, sendo os microrganismos anaeróbicos muito suscetíveis ao oxigênio livre elemento resultante da efervescência, o que limita levar em conta esse resultado como confiável para outros microrganismos. Outro fator importante considerado foi a ausência de relatos de efeitos adversos aos pacientes, como gosto residual desagradável e danos aos materiais da prótese, ainda que os estudos tenham relatado conhecimento do potencial deletério dos hipocloritos em algumas situações. Concluíram que não se pode definir que um método é melhor que outro, que o delineamento dos estudos e suas publicações devem ser de mais qualidade, envolver e comparar mais indivíduos institucionalizados e não institucionalizados, confrontando os diversos métodos mecânicos e químicos e suas associações, em estudos randomizados, incluindo também usuários de PPR.

Vieira et al., 2010, avaliaram a eficiência de higienizadores em evitar a recolonização de *C. albicans* e *C. glabrata* em resina de reembasamento. Em corpos de prova confeccionados e reembasados com polimetil metacrilato, no formato de disco (10 mm x 1,5 mm) e esterilizados, os microrganismos foram inoculados e houve crescimento de biofilme por 48 horas com troca de meio com 24 horas. Os higienizadores avaliados foram Polident 3 minutes® (POL) em imersão de 3 minutos, Efferdent® (EFF) em imersão de 15 minutos, Hipoclorito de sódio a 0,5% (HIP) em imersão de 10 minutos e controle em água destilada estéril em imersão de 15 minutos. Após os processos de higienização, houve desprendimento dos microrganismos em ultrassom para contagem de UFC e também foram obtidos corpos de prova que após a higienização foram lavados com PBS e colocados novamente no meio de cultura estéril, trocado a cada 24 horas, para verificar recolonização em período total de 48 horas. Os resultados do efeito antimicrobiano foram similares para os higienizadores à base de peróxido alcalino, com reduções significativas de *C. albicans*, mas sem reduções significativas de *Candida glabrata*, quando comparados ao controle. No estudo da recolonização não houve eficiência em evitar colônias de *C. glabrata* nem de *C. albicans* pelos peróxidos alcalinos. Apenas o hipoclorito foi capaz de reduzir totalmente o biofilme e evitar a recolonização para as duas leveduras.

Li et al., 2010, verificaram a eficiência de um higienizador em biofilmes específicos de *C. albicans* e *S. mutans*, e biofilme misto proveniente de saliva humana, com e sem adição de *C. albicans*. A incubação e crescimento dos microrganismos ocorreram em corpos de prova de hidroxiapatita, resina acrílica, poliestireno e cerâmica, todos em forma de disco (16 mm x 2 mm). Os corpos de prova foram esterilizados e inoculados com os biofilmes em um período de 20 horas. O higienizador utilizado foi o Polident®, que foi dissolvido em água estéril, no volume indicado pelo fabricante. Para a higienização dos corpos de prova foi utilizado 1 mL da solução por corpo de prova, que ficou imerso por 5 minutos. Os autores também verificaram se os materiais proporcionaram formação diferenciada dos biofilmes de um mesmo microrganismo entre si. Na avaliação dos biofilmes formados nas diferentes superfícies, verificaram que para *S. mutans* a biomassa foi similar nos

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

Uludamar et al., 2010, verificaram, in vivo, a eficácia de 3 higienizadores efervescentes (Polident®, Efferdent® e Fittydent®) e 2 enxaguatórios bucais, um à base de Gluconato de Clorexidina a 0,2% (Corsodyl®) e outro à base de Dióxido de Cloro (CloSYSII®), na redução de *C. albicans* em PTs. Os autores ressaltaram a relação da estomatite protética com o acúmulo de biofilme em próteses maxilares, e que são facilmente colonizáveis por microrganismos existentes na cavidade bucal, como *Candida* spp, e outros normalmente encontrados em regiões extrabucais, como *Staphylococcus* spp. Afirmaram também que entre idosos que dependem de cuidados, que vivem na pobreza ou em abrigos, é comum a falta de higienização em relação às próteses. O estudo foi realizado com 90 pacientes

usuários de prótese que apresentavam estomatite protética leve generalizada, e não apresentavam nenhuma doença sistêmica, além de utilizarem as próteses em média há 3 anos. As coletas para análise do crescimento de *C. albicans* foram realizadas na região do palato, antes e após o processo de higienização. Em relação aos enxaguatórios, cada prótese foi borrifada na região do palato, com um dos dois produtos, de forma padronizada. Para as pastilhas higienizadoras, cada grupo foi imerso em 200 mL de água destilada esterilizada, em recipiente estéril, pelos tempos de 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos. Os resultados indicaram que os enxaguatórios propiciaram redução significativa de *C. albicans*, entre as pastilhas, apenas o Fittydent® favoreceu a redução significativa em 60 minutos de imersão. Concluíram que os enxaguatórios estudados podem ser alternativas viáveis e que mais estudos devem ser realizados sobre higienização de prótese.

Peracini et al., 2010, realizaram um estudo sobre hábitos de higienização em 106 portadores de PT. No levantamento dos dados, informações como tempo de edentulismo, tempo de uso da prótese, idade da prótese, orientações prévias sobre higienização da prótese, forma e frequência de higienização da prótese, regiões da cavidade oral que também eram higienizadas, dificuldades na higienização da prótese, uso de algum tipo de enxaguatório bucal e uso contínuo da prótese, foram obtidas por meio de questionário. De acordo com os resultados, 62,26% dos usuários tinham a mesma PT maxilar há 5 anos, 49,06% a mesma PT mandibular por 5 anos, 24,53% a mesma PT maxilar há mais de 20 anos e 16,04% a mesma PT mandibular também por mais de 20 anos. Em relação às orientações de higiene, 51,89% disseram nunca ter recebido orientações do cirurgião dentista, mas 100% disseram escovar suas próteses, sendo que 84,91% associavam a escovação a algum dentífrico. A imersão das próteses em algum tipo de solução foi relatada por 58,49% dos pacientes, sendo que 24 dos examinados utilizavam apenas água para imersão, outros 21 indivíduos utilizavam hipoclorito de sódio e apenas 3 indivíduos relataram utilizar pastilhas efervescentes, sendo que a associação dessas pastilhas no momento da escovação foi relatada apenas por 1 paciente. A higienização diária foi relatada por 99,06% dos pacientes avaliados, sendo que 73,58% realizavam 3 vezes ou

mais por dia. Pacientes relataram dificuldade de higienização no flanco labial interno, superfícies internas e entre os dentes das próteses. O uso noturno de prótese foi relatado por 58,49%. A partir de todos esses dados, os autores concluíram que os pacientes demonstravam conhecimento limitado sobre os métodos de higienização oral e da prótese, que a escovação era o método de escolha para higienização e a maioria utilizava a mesma prótese há 5 anos ou mais, além de dormir com a prótese.

Avaliar a remoção de biofilme e a eficiência antimicrobiana de um higienizador, em PTs, foi o objetivo do estudo de Silva-Lovato et al., 2010. Os autores selecionaram usuários de PT para comparar o método convencional de escovação das próteses com a introdução de um higienizador em conjunto com a escovação. Foram obtidos dois grupos: um que realizava escovação de suas próteses três vezes ao dia, após as refeições, e outro que também escovava, e realizava a imersão da prótese, uma vez ao dia por 15 minutos, em 150 mL de água onde se dissolia um tablete de Nitradine® (Medical Interporous). Para avaliação, a superfície interna das próteses foi corada com evidenciador de biofilme e, posteriormente, foi realizada a escovação com sabonete líquido para remoção total do biofilme previamente aderido e as comparações ocorreram entre os grupos no momento final do experimento. Após os 21 dias do experimento, foram realizados novamente a evidenciação de biofilme e fotos digitais padronizadas, para comparar a área de cobertura de biofilme. Para comparar a efetividade antimicrobiana, realizaram a remoção do biofilme, por escovação em solução salina, e a cultura de leveduras de *Candida* spp. Os autores realizaram a contagem a partir de unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados demonstraram evidente e significativa diferença entre os grupos, na superfície interna das próteses cobertas por biofilme, ficando a média de 37,5% para o grupo de escovação (Controle) e 4,7% para o grupo de escovação + Nitradine® (Experimental). Para contagem de UFC os autores também verificaram diferença significativa entre os grupos, sendo que o grupo experimental apresentou menor quantidade de UFC. Ressaltaram a facilidade de uso das pastilhas higienizadoras avaliadas, concluindo que, devido aos altos valores relacionados ao biofilme obtidos no grupo controle quando comparado ao experimental, o uso regular desse tipo de higienizador é

recomendado para reduzir a proliferação de microrganismos que atuam no surgimento da estomatite protética.

Orsi et al., 2010, realizaram estudo para avaliar a desinfecção de coroas metálicas, devido a necessidade de se evitar a contaminação cruzada que pode ocorrer nas provas clínicas de peças protéticas e sua posterior manipulação pela equipe odontológica e laboratorial. Foram obtidas 96 coroas padronizadas de Ni-Cr onde 6 foram destinadas ao grupo controle e as demais divididas em grupos (n=18) de acordo com os microrganismos utilizados: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. albicans*. Cada um desses grupos foi submetido a 3 diferentes higienizadores por diferentes períodos de tempo, sendo eles: Hipoclorito de sódio a 1%, a 2% e Cidex, nos tempos de 5, 10 e 15 minutos de imersão em cada higienizador. Após a contaminação das coroas, pelos respectivos microrganismos em período de 30 minutos, cada duas coroas eram imersas nas soluções pelos períodos determinados, e colocadas em tubos individuais com meio de cultura do tipo Letheen Broth, para todos os microrganismos, com exceção do *S. mutans*, para o qual foi utilizado meio específico. As coroas do grupo controle, uma para cada microrganismo, também passaram pelos mesmos procedimentos, exceto a higienização. A verificação da presença de microrganismos nos tubos de ensaio foi realizada por 3 avaliadores, a partir da observação de turvação ou sedimentação no meio de cultura, no período de 48 hrs e 7 dias, com os tubos em estufa a 35°C e então removidos e submetidos à temperatura local da sala onde permaneceram até o 12º dia para a 3ª leitura. Observaram crescimento de microrganismos apenas nas coroas do grupo controle, sendo que para as coroas submetidas aos métodos de higienização citados, nenhuma apresentou sinais de crescimento de microrganismos em nenhum dos tempos de leitura. Os autores concluíram que os 3 métodos utilizados foram eficazes na desinfecção das coroas contaminadas com os microrganismos selecionados, independentemente do tempo de imersão.

De Freitas Fernandes et al., 2011, realizaram estudo para avaliar a eficiência antimicrobiana de higienizadores de prótese em corpos de prova de dois tipos de resina, Polimetil Metacrilato e Poliamida, contaminados com *C. albicans* e *C. glabrata*, inoculados de forma isolada e em conjunto (biofilme

misto). Utilizaram 116 corpos de prova de cada tipo de resina, em formato de disco (10 mm x 2 mm), sendo 20 corpos de cada resina para medir energia de superfície e os demais divididos em um total de 24 grupos, 12 de cada resina, com n=8. Foram utilizados dois tipos de pastilhas higienizadoras (Polident® e Corega Tabs®), hipoclorito de sódio a 0,5% e água como controle. Foi realizada a imersão dos corpos de prova, em 8 mL de água deionizada estéril a 40°C, nos tempos de 3 minutos para Polident® e 5 minutos para Corega Tabs®. O grupo do hipoclorito ficou imerso por 10 minutos, assim como o controle em água deionizada estéril. Para avaliar a ação antimicrobiana utilizaram contagem de UFC. Os resultados mostraram energia de superfície com valor significativamente maior para polimetil metacrilato e todos os biofilmes, isolados e em conjunto, apresentaram maior crescimento na poliamida. Os biofilmes isolados de *C. glabrata* apresentaram maior leitura de UFC após todos os tratamentos. e o biofilme misto não apresentou diferenças significativas em relação aos biofilmes isolados. Verificaram que os dois higienizadores proporcionaram redução significativa das duas leveduras, tanto no biofilme isolado como misto em relação ao controle, porém apenas o hipoclorito foi capaz de proporcionar leitura zero de UFC para as duas leveduras, tanto isoladas como em conjunto.

Salerno et al., 2011, verificaram por meio de revisão bibliográfica a associação entre estomatite protética e *C. albicans*. Os autores afirmaram que a estomatite protética associada à *C. albicans* está presente em até 60% a 65% dos usuários de prótese e considerando aqueles usuários que não apresentam sinais clínicos, esse microrganismo pode estar presente em até 75% dos usuários de prótese. A *C. albicans* foi apontada como a principal responsável pela estomatite protética, mas outras cepas como *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e, principalmente, *C. glabrata*, também estão associadas. Em relação à patogenicidade da *C. albicans*, ressaltaram fatores sistêmicos como diabetes, infecções renais e xerostomia, e fatores locais como traumas, qualidade da saliva, pH da cavidade oral, permeabilidade e porosidade da resina acrílica, como facilitadores da adesão, acúmulo de biofilme. Afirmaram que o processo de adesão da *Candida* se beneficia de inflamações causadas por bactérias, aumentando sua proliferação. Destacaram

a dificuldade de tratamento, devido às características multifatoriais da estomatite protética e o uso de antifúngicos locais e sistêmicos, além de medidas de desinfecção das próteses. Relataram sobre a clorexidina em concentração de 0,2% para bochechos, mas que seu uso seria contra indicado em associação à nistatina, pois inibe sua ação antifúngica. Recomendaram a concentração de 2% para imersão da prótese, associada à terapia tópica, ou também a imersão em hipoclorito, que teria efetividade sobre *Candida*, mas que o uso prolongado do hipoclorito seria contraindicado, pois levaria a danos nas próteses. A irradiação por micro-ondas também foi mencionada como efetiva para eliminação de *Candida* e bactérias, mas poderia causar alterações dimensionais nas próteses. Por fim, a remoção mecânica, por meio da escovação, associada a substâncias químicas, seria a forma mais efetiva de prevenção e tratamento, sempre associada à devida higiene oral. Ressaltaram a necessidade da remoção noturna das próteses e do armazenamento a seco nesse período. Concluíram então, que a estomatite protética associada à *Candida* é a principal forma de candidíase, com localização preferencial na mucosa do palato. O principal fator etiológico seria o acúmulo de biofilme na prótese, especialmente em regiões de contato com a mucosa. Portanto, métodos de higienização eficientes das próteses deveriam ocorrer mesmo em pacientes assintomáticos, pois próteses podem ser verdadeiras reservas de microrganismos, que favorecem a estomatite protética e outras infecções, contribuindo para o aumento da reabsorção óssea alveolar. A devida remoção e controle do biofilme constituem os métodos mais efetivos, seja na prevenção ou no tratamento da estomatite protética.

No estudo sobre os fatores que contribuem para estomatite protética, Naik e Pai, 2011, avaliaram 100 pacientes, onde 70 apresentavam algum nível de inflamação abaixo da base protética, e outros 30 sem sinais ou sintomas de inflamação, considerado como o grupo controle. Verificaram a relação da estomatite protética com fatores como saliva, higiene oral e da prótese, e idade da prótese, assim como a relação com colonização por *Candida* spp. Os fatores como saliva, higiene oral ou da prótese, e idade da prótese não apresentaram nenhuma relação significativa entre os grupos. O que foi observado foi relação direta do nível de inflamação com a má higienização, e a

relação direta e significativa entre os grupos da *C. albicans* e a estomatite protética, ainda que esta levedura tenha aparecido também em parte do grupo controle. Os autores concluíram que, além das relações apresentadas, o grau de contaminação das próteses por *C. albicans* tem relação direta com o nível de inflamação da mucosa, que a má higienização oral e da prótese pode ser fator de predisposição local à estomatite protética. Ressaltaram ainda que, instruções de higiene, acompanhamentos e manutenções das próteses, com foco na saúde oral, são necessários.

Preshaw et al., 2011, estudaram a associação da utilização de PPRs com a saúde oral e sistêmica de seus usuários. Esse estudo foi realizado a partir de intenso levantamento bibliográfico onde selecionaram artigos pertinentes ao assunto, especialmente experimentos randomizados controlados. O levantamento realizado permitiu concluir que a utilização de PPR pode levar ao aumento de biofilme e gengivite, especialmente nos dentes pilares, assim como aumento do risco de cáries, especialmente radiculares. Afirmaram que retornos periódicos devem sempre ser realizados por usuários de PPR para os devidos cuidados. Não encontraram evidências de que a utilização da PPR prejudica a nutrição ou saúde geral do paciente.

Ao ressaltarem a necessidade da desinfecção de instrumentos e materiais odontológicos, juntamente com a escassez de informação sobre contaminação de próteses em relação aos laboratórios, Williams et al., 2011, verificaram a existência de contaminação em PPRs produzidas em diferentes laboratórios, um interno e outro externo, armazenadas em duas clínicas de unidade de ensino, e que tipos de microrganismos estariam presentes nessas contaminações. Os autores relataram que, apesar de que algumas contaminações possam ser consideradas aceitáveis e sem patogenicidade considerável, todo nível de contaminação deve ser evitado. Investigaram um total de 40 próteses armazenadas nas clínicas, quanto a presença, nível e tipo de contaminação. Os pesquisadores identificaram contaminação em 58% das amostras e em 38% dessas amostras havia alto nível de contaminação (>42000 UFC/cm²). Das bactérias isoladas houve predominância de *Bacillus spp.* (57%), *Pseudomonas spp* (22%) e *Staphylococcus spp* (13%). *Candida spp* foi detectada em 38% das amostras. Não houve diferença significativa de

contaminação das próteses em relação ao laboratório ou sua clínica de armazenamento. Contudo, o nível de contaminação foi significativamente maior para as próteses armazenadas em saco plástico com fluido em comparação com as que estavam adaptadas aos modelos. Duas próteses que haviam sido submetidas à descontaminação antes do armazenamento não apresentaram crescimento de microrganismos. A pesquisa mostrou que as próteses recebidas de laboratórios são muitas vezes contaminadas e, por conseguinte, existe necessidade de desinfecção rotineira das próteses e materiais associados antes da sua utilização.

Rossato et al., 2011, verificaram a eficiência de remoção de biofilme bacteriano de dispositivos intra orais, simulando próteses, por meio de 6 métodos de higienização usuais em 15 estudantes de Odontologia. Os métodos consistiam em utilização de água corrente por 20 segundos, imersão em peróxido alcalino (Corega Tabs®) por 5 minutos e por 30 minutos, escovação com água e sabonete líquido por 40 segundos, hipoclorito alcalino a 0,5% por 10 minutos e solução clorada para uso caseiro (Q'boa®) a 0,45%, diluindo 10 mL em 200 mL de água, por 10 minutos. Os dispositivos foram confeccionados com resina acrílica, a partir de moldes individuais, e fixados com grampos de fio de aço. Para o devido acúmulo de biofilme, cada dispositivo era utilizado por 24 horas e, nesse período, era imerso 8 vezes em solução de sucrose a 20%. Para avaliar o grau de higienização foram utilizadas fotografias digitais padronizadas da superfície dos dispositivos correspondente à cobertura do palato, que foram corados com evidenciador de biofilme. Por ordem decrescente de eficiência, os resultados indicaram o hipoclorito alcalino a 0,5%, Q'boa, escovação com sabonete líquido, Corega Tabs® por 30 minutos, Corega Tabs® por 5 minutos e água corrente. Entretanto, diferenças significativas foram verificadas apenas entre o controle positivo (água corrente) e todos os demais métodos e entre o hipoclorito alcalino a 0,5% e o Corega Tabs® por 5 minutos. Como a escovação com sabonete líquido não apresentou diferenças significativas em relação aos demais métodos, os autores enfatizaram a indicação de se associar imersão em soluções higienizadoras à escovação das próteses. Concluíram que os métodos que utilizaram hipoclorito são os mais eficientes, que o peróxido alcalino deve ser utilizado

preferencialmente por 30 minutos e que foi extremamente similar à escovação com sabonete líquido, mas que os resultados não podem ser totalmente extrapolados aos usuários de prótese, pois, a amostra era pequena e composta por jovens estudantes de Odontologia.

Felipucci et al., 2011, estudaram os efeitos de higienizadores na liberação de íons e alteração de peso. Para isso utilizaram corpos de prova mistos de metal, em forma de disco (12 mm x 3 mm), inseridos em resina acrílica, em formato retangular (38 mm x 18 mm x 4 mm). Os higienizadores utilizados foram Periogard® (PE), Cepacol® (CE), Corega Tabs® (CT), Medical Interporous® (MI), Polident® (PO), hipoclorito de sódio a 0,05% e água destilada (AD) como controle, e seus efeitos foram verificados em duas ligas de Co-Cr, DeguDent® (DD) e Vera PDI® (VPDI). Foram obtidas medidas de peso em balança de precisão antes das imersões (T0). Foram simuladas 180 imersões, relativas ao tempo sugerido pelos fabricantes, dos higienizadores efervescentes (CT, MI e PO), e para as demais substâncias consideraram o tempo de 10 minutos para cada imersão. Os higienizadores foram diluídos em 200 mL de água destilada a 45°C, os recipientes mantidos em estufa, garantindo a temperatura, e realizaram troca das soluções a cada 8 horas para manter a ação efetiva. Leituras referentes aos íons foram obtidas no preparo das soluções e ao fim das imersões, e como leitura final de peso após os processos (T1). Para evitarem resíduos nos recipientes, estes foram higienizados com solução de ácido hidrocloreídrico e lavados com água destilada, os corpos de prova também foram lavados com água destilada entre as trocas de soluções. Os resultados demonstraram que CT e MI proporcionaram a maior redução de massa, com VPDI apresentando a maior alteração em relação a DD, e houve maior liberação de íons com hipoclorito de sódio e MI. Concluíram que o hipoclorito de sódio e MI não são indicados como auxiliares químicos na higienização de PPRs.

Felipucci et al., 2011b, estudaram os efeitos de higienizadores na superfície dos materiais que compõem as PPRs. Confeccionaram corpos de prova mistos de resina acrílica e ligas de Co-Cr (DeguDent e Vera PDI). Foram avaliados os seguintes higienizadores: Periogard® (0,12% digluconato de clorexidina), Cepacol® (cloridrato de cetilperidínio 0,500mg), Corega Tabs®

(perborato de sódio e enzimas), Medical Interporous® (ácido cítrico) e Polident® (perborato de sódio e enzimas). Os corpos metálicos foram polidos e incluídos em matrizes de resina acrílica (38 mm x 18 mm x 4 mm). Foram obtidos 70 corpos de prova, 35 de cada liga, distribuíram em 7 grupos com 5 corpos para cada liga, sendo um grupo para cada tipo de higienizador, além de grupos controle em água destilada e hipoclorito de sódio a 0,05%. Foram obtidas leituras de rugosidade e peso antes e após os procedimentos de higienização. As pastilhas efervescentes e os espécimes foram imersos em 200 mL de água destilada morna (45°C). Foram simuladas 180 imersões, correspondente a um período de 6 meses de uso, sendo para 15 minutos para Medical Interporous®, 5 minutos para Corega Tabs®, 3 minutos para Polident® e 10 minutos para os enxaguatórios, água destilada e hipoclorito de sódio. Concluíram que, apesar de verificado aumento da rugosidade nas ligas avaliadas, clinicamente não seria significativo e que também não ocorreu diferença estatística na rugosidade para resina acrílica. Porém, foram observados escurecimento e oxidação nas ligas metálicas, com o uso de Medical Interporous® (ácido cítrico) e hipoclorito de sódio a 0,05%. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio e o Medical interporous não devem ser indicados para higienização de PPR.

Dhamande et al., 2012, verificaram a eficiência antimicrobiana de higienizadores em biofilme de *C. albicans*, utilizando corpos de prova de resina acrílica em formato quadrangular (15 mm x 1,5 mm), que foram esterilizados e distribuídos em 4 grupos para 3 higienizadores e um controle positivo. Os higienizadores utilizados na forma de pó foram Viclean® (VI, hipoclorito de sódio), Clinsodent® (CL, (lauril sulfato de sódio) e e em tablete o Fittydent® (FI, hipoclorito de sódio). Os corpos de prova foram esterilizados e inoculados, passando por 2 horas de adesão e 144 horas de crescimento. Fizeram leitura de UFC dos grupos antes e depois das higienizações, sendo que as higienizações ocorreram por imersão de 8 horas, com a diluição de acordo com os fabricantes. Além da leitura de UFC dos corpos de prova, os autores também testaram as soluções higienizadoras em suspensão fúngica, sem corpos de prova, com leituras em 5, 30, 60, 90 e 120 minutos. Houve maior redução de UFC nas imersões em CL, e houve na suspensão fúngica redução

crescente conforme o avanço das leituras sendo que os higienizadores VI e CL apresentaram redução maior que FI. Os autores concluíram que o higienizador à base de lauril sulfato de sódio foi mais eficiente que os demais na ação lítica e remoção de biofilme e que o tempo influenciou na ação lítica dos higienizadores estudados, ou seja, houve aumento da ação lítica em função do tempo.

Li et al., 2012, estudaram a superfície de materiais utilizados em prótese sobre implantes tipo overdenture e a capacidade da *C. albicans* em aderir e crescer nessas superfícies, o papel da mucina na formação do biofilme e também a remoção da *C. albicans* desses materiais. Confeccionaram corpos de prova de 7 diferentes materiais, incluindo liga de Co-Cr, além de um grupo controle de colágeno tipo I. Os espécimes de Co-Cr apresentavam rugosidade superficial de $0,085 \pm 0,021 \mu\text{m}$. Em relação à remoção do biofilme não foi utilizado nenhum método higienizador, apenas a mensuração das células removidas após a formação e crescimento do biofilme quando os corpos de prova foram submetidos a um leve enxágue com PBS, pois a intenção era verificar se o recobrimento com mucina influenciaria na remoção de células a partir desse enxague simples. Todos os materiais estudados mostraram adesão do microrganismo, formação e crescimento de biofilme. Na remoção de biofilme, quando não recobertos por mucina, os materiais não metálicos estudados apresentaram piores resultados que os materiais metálicos e zircônia. Porém, quando recobertos por mucina, houve aumento na remoção de microrganismo em Ti, resina acrílica e Au-Ag-Pd e redução da remoção em colágeno, hidroxiapatita, PET (Polietilenotereftalato) e Co-Cr.

Pellizzaro et al., 2012, verificaram a eficiência da combinação entre escovação e diferentes tipos de higienizadores na redução do biofilme de *C. albicans*. Os autores ressaltaram a relação que a literatura traz entre estomatite protética e *Candida* spp, além de que a escovação com dentífrício, apesar de eficiente na remoção mecânica, pode causar danos aos materiais da prótese. Foram confeccionados 90 corpos de prova em resina acrílica, esterilizados e incubados com *C. albicans*. Foram então obtidos 10 grupos, um controle positivo sem higienização, um escovado apenas com água e nos outros oito grupos 4 escovados, cada um com um agente higienizador, simulando

escovação diária com 90 golpes, com dentifrício, clorexidina a 2%, hipoclorito de sódio a 1% e Polident Fresh Cleanser, e os outros 4 grupos foram imersos nessas mesmas soluções por 90 segundos. Os resultados evidenciaram que a escovação associada a qualquer uma das substâncias higienizadores, inclusive água destilada, reduziu significativamente a viabilidade do biofilme da *C. albicans*, tendo clorexidina e hipoclorito chegado a níveis de 100% de redução. Na imersão, salvo água destilada que não foi testada, a clorexidina apresentou o melhor resultado chegando a 100% de redução em 90 segundos. Polident apresentou 90%, dentifrício 89% e hipoclorito 88% de redução de *C. albicans*.

Davi et al., 2012, avaliaram os efeitos de soluções higienizadoras na rugosidade e liberação de íons de materiais constituintes de próteses. Espécimes metálicas circulares de Ni-Cr, Ni-Cr-Mo-Ti, Ni-Cr-Be e titânio puro, foram incluídos com resina para obtenção de corpos de prova mistos, mantendo uma face metálica exposta para as análises. Os grupos foram imersos nas seguintes soluções: NaOCl a 0,05%, Clorexidina a 0,12% (Periogard®), 0,500 mg de Cetylperidínio (Cepacol®) por 10 minutos, Corega Tabs® (Perborato de sódio e enzimas) por 5 minutos, Medical Interporous® (Ácido cítrico) por 15 minutos e Polident 3 minutes® (Perborato de sódio e enzima) por 3 minutos. Houve também um grupo controle que foi imerso em 200 mL de água deionizada por 15 minutos. Foram simuladas 180 imersões. Para verificar a liberação de íons as soluções eram analisadas antes e depois das imersões, assim como para rugosidade superficial os corpos de prova eram analisados antes e depois das imersões. Houve maior liberação dos íons Ni e o Be, especialmente com Medical interpouros® e aumento da rugosidade superficial da resina com o Cepacol, mas não foi observada alteração de rugosidade nas ligas metálicas. Os autores ressaltaram que mais estudos seriam necessários, especialmente com o intuito de verificar de fato a efetividade antimicrobiana de alguns dos higienizadores, além dos efeitos adversos. Concluíram que o Cepacol® e Medical interpouros® devem ser indicados com cautela para uso diário regular, pela rugosidade da resina acrílica e liberação de íons que ocasionaram respectivamente.

Nishi et al., 2012, publicaram estudo sobre métodos de higienização de prótese e sua relação com os microrganismos encontrados, uma vez que a má

higienização das próteses proporciona verdadeiros reservatórios de microrganismos que podem tanto influenciar o desenvolvimento de doenças bucais como a estomatite protética ou doenças sistêmicas, especialmente nos mais idosos. Os pacientes desse estudo não possuíam doenças bucais, eram usuários de prótese total superior e inferior e estavam satisfeitos com a higienização de suas próteses, realizada por eles mesmos, sendo que parte dos pacientes era institucionalizada e outra parte não. Com relação aos métodos de higienização, observaram que o uso de escovação era significativamente maior nos pacientes externos que nos institucionalizados. Já a utilização de um método químico de imersão era realizada de forma proporcional nos dois grupos, sendo que, em ambos, cerca de 42% dos pacientes utilizavam esses métodos diariamente. Os agentes químicos mais utilizados por esses grupos foram Polident®, utilizado por 78,7% dos pacientes externos e 64,7% dos institucionalizados, e Toughdent®, utilizado por 6,3% dos pacientes externos e 35,3% dos institucionalizados. A forma de utilizar esses higienizadores foi acima de 94% no período noturno nas duas populações, e os demais por menos de 30 minutos de imersão. Os quatro principais tipos de microrganismos encontrados foram *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e *Neisseria* spp. A escovação propiciou quantidade significativamente reduzida de microrganismos nos pacientes externos, mas sem diferenças nos institucionalizados. Houve redução significativa de microrganismos na frequência de uso diário ou de 3 a 4 vezes por semana de métodos químicos, em relação aqueles que utilizavam apenas uma vez ou menos por semana. Os autores afirmaram que existe relação da quantidade de microrganismos com o método e frequência de higienização, recomendando a escovação associada a um método químico diário.

Duyck et al., 2013, realizaram estudo para verificar o crescimento e composição de biofilme em PTs submetidas a diferentes armazenamentos noturnos: a seco, em água ou pastilha higienizadora à base de peróxido alcalino (Corega Tabs anti-bacteria®). Foram utilizados 51 usuários de PT institucionalizados. As coletas de biofilme ocorreram de forma padronizada na região do 2º pré-molar da prótese mandibular e antes do experimento todas as próteses foram desinfetadas e limpas com escovação e água e dentifício com

clorexidina. O experimento foi realizado em duas semanas, os usuários faziam a higienização das próteses com escova e sabão neutro, exceto nas áreas de coleta citadas, e cada grupo fazia um tipo de armazenamento noturno. Uma coleta e leitura ocorreu no 7º dia, que os autores colocaram como desenvolvimento do biofilme (dBF), e outra leitura no 14º dia, considerada a maturação do biofilme (mBF). O método de leitura utilizado foi de reação em cadeia de polimerase (RCP). Foram medidas quantidades totais de biofilme bacteriano, de diversas bactérias específicas e *C. albicans*. Os resultados demonstraram redução significativa do biofilme total com armazenamento no higienizador, nas duas leituras, em relação ao armazenamento a seco e em água, que não apresentaram diferenças significativas entre si. Considerando as bactérias individualmente, o higienizador proporcionou redução de 6 cepas de diferentes formas. Os microrganismos *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *S. constellatus*, *A. odontolyticus* e *V. parvula* apresentaram redução significativa com o higienizador em comparação ao armazenamento a seco na leitura dBF e para *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *V. parvula*, a redução se manteve em mBF. Os microrganismos *Capnocytophaga* spp. e *V. parvula* também apresentaram redução significativa com o higienizador em comparação ao armazenamento em água em dBF. Para *C. albicans*, que foi encontrada em todas as amostras de todos os grupos, houve redução significativa com o higienizador em comparação à água para as duas leituras, dBF e mBF, sendo que o armazenamento a seco foi intermediário e sem diferenças significativas em relação aos outros dois tipos de armazenamento. Os autores concluíram que o armazenamento noturno é um fator importante nos estudos que envolvem a saúde de usuários de próteses removíveis e que a utilização de higienizador à base de peróxido alcalino é capaz de reduzir *C. albicans* e a quantidade de biofilme bacteriano, causando modificações nesse biofilme também. Dessa forma, o higienizador além de reduzir a quantidade de microrganismos que podem prejudicar a saúde bucal, também inibe a formação de um biofilme fúngico mais complexo, destacando os resultados obtidos como extremamente importantes, sobretudo para os pacientes institucionalizados.

De Sousa Porta, 2013, avaliaram a ação do hipoclorito na redução de microrganismos e seus efeitos sobre a resina acrílica. Foram selecionados 15

usuários de PT que foram instruídos a realizarem imersões diárias em hipoclorito de sódio a 0,5% por 3 minutos, durante 90 dias, após a escovação noturna das próteses. Os autores também verificaram o nível de satisfação com a higienização das próteses pelos usuários. Para contagem microbiana utilizaram o método de contagem de UFC retirando material da superfície das próteses e inoculando em meios de cultura por 48 horas. A comparação foi feita entre a saliva não estimulada do paciente e material recolhido da superfície interna, tanto da prótese superior como da inferior. Para avaliar danos à resina acrílica, verificaram a estabilidade de cor, a partir das próteses superiores medida antes e após o período do experimento e a rugosidade superficial, medida em corpos de prova de resina acrílica polida, que foram colados às próteses inferiores, com medição antes da colagem e após o período do experimento. Nas contagens de UFC, tanto de microrganismos totais como de *Candida* spp., os autores relataram redução significativa, o que demonstra a eficiência higienizadora do método. Para estabilidade de cor e rugosidade superficial não encontraram diferenças significativas. Relataram ainda que a satisfação dos pacientes aumentou em relação à higienização das próteses. Concluíram que o hipoclorito de sódio a 0,5%, utilizado diariamente em imersões de 3 minutos, é um método coadjuvante eficiente na redução de microrganismos e seguro para estabilidade de cor e rugosidade da resina acrílica.

A eficácia de higienizadores à base de peróxido alcalino na redução da microbiota em PPRs foi estudada por Lucena-Ferreira et al., 2013, a partir de um estudo clínico. Nesse estudo os pacientes selecionados apresentavam-se saudáveis, tanto na saúde oral quanto sistêmica, eram usuários de PPRs e utilizavam a escovação convencional como único método de higienização. 25 usuários de PPR foram avaliados durante 15 dias, e orientados a mergulhar diariamente suas próteses em solução higienizadora, obtida a partir da dissolução de pastilhas à base de peróxido alcalino (Polident 3 minutes®), pelo período de 3 minutos, uma vez ao dia. Para poder definir a eficácia da ação desse higienizador sobre a microbiota, amostras do biofilme foram retiradas da superfície das PPRs antes do início do período de uso dos higienizadores, para comparação com a análise das amostras de biofilme após o período de

utilização dos higienizadores. As comparações ocorreram por meio da contagem total de microrganismos e também específica de *S. mutans* e *Candida* spp. Os autores observaram redução significativa no total de microrganismos, como também de *S. mutans*, mas sem nenhuma diferença significativa para *Candida* spp. Os autores relataram que a ação d higienizador teria sido proporcionada pela ação mecânica da efervescência, assim como pela liberação de peróxidos de hidrogênio e do oxigênio ativo que possuem ação antimicrobiana, além da presença de enzimas que quebram proteínas do biofilme. Os autores consideraram a hipótese de que essa diferença de ação em relação aos microrganismos poderia ser atribuída ao fato de que no biofilme misto, os *Streptococcus* spp. ocupam uma camada mais superficial do biofilme e estariam mais expostos aos efeitos dos higienizadores, podendo ainda produzir uma camada de glucana que protegeria os microrganismos abaixo, como a *Candida* spp.

Faot et al., 2014, avaliaram a eficiência da higienização com ácido cítrico em corpos de prova circulares (10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura) de resina acrílica, contaminados com *C. albicans*, e a sua posterior recolonização. Os autores utilizaram um grupo controle que foi imerso apenas em água, e outros dois grupos onde o higienizador à base de ácido cítrico (Curaden BDC 105, Curaprox) foi dissolvido, em um grupo na concentração de 1:5 e em outro na concentração de 1:8, concentrações recomendadas pelo fabricante para uso semanal ou diário, respectivamente. Antes da inoculação com o microrganismo, os corpos de prova estéreis foram submetidos à formação de uma película adquirida salivar também estéril. Em todos os grupos a imersão foi por 8 horas. A maturação do biofilme ocorreu por 72 horas antes dos procedimentos de higienização. Após as higienizações parte dos corpos de prova de cada grupo passou para coleta dos microrganismos imediata, e a outra para coleta após 48 horas. Na coleta imediata após as higienizações, nas duas concentrações de ácido cítrico, não houve contagem de células viáveis, porém as leituras após 48 horas demonstraram que os processos de higienização não impediram a recolonização dos corpos de prova, ainda que em uma quantidade significativamente menor que o grupo controle. Os autores também realizaram leitura da estrutura do biofilme a partir de técnicas de

microscopia eletrônica e verificaram diferenças significativas tanto no período pós-higienização, imediato e 48 horas, como também entre as concentrações de ácido cítrico utilizadas. Imediatamente após as higienizações, o biofilme sujeito à concentração 1:5 foi mais afetado que à concentração 1:8 e controle, assim como no período após 48 horas, o biofilme sujeito à concentração 1:8 apresentou maior volume e espessura do que a 1:5. Os autores concluíram que o ácido cítrico reduziu a viabilidade da *C. albicans*, mas não foi capaz de impedir sua recolonização.

A revisão sistemática realizada por Jeyapalan e Krishnan, 2015, teve como objetivo relacionar o edentulismo parcial com idade, gênero, condição socioeconômica e incidência das diferentes classes de Kennedy. O levantamento realizado, com estudos de 1990 a 2014, evidenciou que as perdas dentais são motivadas principalmente por cáries e doenças periodontais, além de traumas, dentes supranumerários, neoplasias e cistos. Também observaram que a perda dental tem relação direta com a idade, sendo que as perdas nos mais jovens acarretam a incidência principalmente de classe III ou IV de Kennedy e, nos mais idosos, existe prevalência de classe I ou II. Condições socioeconômicas desfavoráveis também favorecem a perda dental, como baixa renda e/ou baixo nível de instrução. Em relação ao arco dental, observaram maior incidência de perda dental na mandíbula em relação à maxila.

O estudo prospectivo de Ercalik-Yalcinkaya e Özcan, 2015, foi realizado para avaliar a relação entre os hábitos de higiene e uso de próteses totais e/ou parciais, relatados por seus usuários, com lesões na mucosa oral. Entre 2009 e 2011 foram examinados 400 pacientes usuários de PPR e/ou PT, tanto na maxila, mandíbula ou nas duas arcadas. Os pacientes foram então diagnosticados, seguindo então as análises dos resultados obtidos, que em relação às próteses indicaram um percentual de 39,5% usuários de PPR bimaxilar, 24% PT em um arco e PPR em outro e 21,5% PT bimaxilar. Em relação ao tempo de uso das próteses, 27% utilizavam há mais de 11 anos e 41,3% há menos de 5 anos. Em relação à higiene das próteses, 23% apresentaram higienização precária, sendo que a frequência de higienização variou em uma a 3 vezes ao dia, e 85,8% relataram fazer essa higienização

com escova e sabão/dentífrico. O uso noturno das próteses foi relatado por 64,5% dos pacientes e apenas 3,3% imergiam a prótese em algum produto químico com frequência. Em relação às lesões da mucosa oral, 75% das mulheres e 70,9% dos homens apresentaram lesões na mucosa, sendo que desse total 37,8% foram considerados como lesões relacionadas às próteses. Diversas outras lesões não relacionadas às próteses também foram observadas. Encontraram diferença significativa de que usuários de PT apresentavam mais lesões na mucosa que usuários de PPR e que uso noturno, idade avançada da prótese (>11 anos) e imersão da prótese em água e solução química aumentaram a incidência de lesões significativamente. Os autores concluíram que o tempo de uso da prótese e seu armazenamento noturno influenciaram as lesões na mucosa mais que a frequência de higienização e que deixar a prótese seca, durante o período noturno, não teria influência significativa no desenvolvimento das lesões da mucosa oral.

Kiesow et al., 2015, realizaram estudo para verificar a compatibilidade de materiais protéticos com substâncias higienizadoras, normalmente utilizadas por usuários de prótese, assim como a efetividade na redução de microrganismos proporcionada por essas substâncias. Foram utilizados: pastilha higienizadora com liberação de peróxido (Polident 3 minutes triplemint®), hipoclorito de sódio a 6%, vinagre puro, dentífrico, sabão, álcool absoluto, enxaguatórios bucais (Listerine Original®), Superdrug Chlorhexidine Mouthwash 0,2%® (Superdrug®) e água. Os materiais estudados foram liga de Co-Cr, resina acrílica, aço inoxidável e soldas. Para análise da compatibilidade dos materiais foram utilizadas imersão pura e imersão associada à escovação, e avaliaram as superfícies com microscópio eletrônico de varredura e rugosímetro. Em relação aos espécimes de Co-Cr, em formato de quadrado (10 mm x 1mm), não houve nenhuma alteração na superfície com as pastilhas higienizadoras, porém quando associada à escovação, observaram marcas na superfície, fato que ocorreu com os outros métodos de higienização. O hipoclorito também causou alterações na superfície de corpos de prova de Co-Cr, como manchas e corrosão, sendo que os demais higienizadores não causaram danos, mas deixaram leves resíduos. Para análise da efetividade antimicrobiana, os autores utilizaram protocolos de suspensão bacteriana e

fúngica, sem corpos de prova, com ação de 5 minutos, e os seguintes microrganismos foram inoculados: *C. albicans*, *S. mutans*, *K. pneumoniae*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*. A ação antimicrobiana foi obtida com o hipoclorito de sódio, pastilha higienizadora, clorexidina (enxaguatório Superdrug®) e Listerine®. Concluíram que apenas a pastilha higienizadora e a clorexidina foram razoavelmente compatíveis com os materiais protéticos.

Salles et al., 2015, verificaram a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio, nas concentrações de 0,25% e 0,5%, e também do óleo de mamona a 10%. Para isso utilizaram corpos de prova de resina acrílica quadrados (10 mm x 2 mm) contaminados com os microrganismos: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. glabrata*. Todas as soluções higienizadoras, além de um controle positivo em solução salina, foram utilizadas por 20 minutos de imersão dos corpos de prova contaminados. Para verificar a eficiência e comparação com o grupo controle utilizaram a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). A aderência dos microrganismos aos corpos de prova ocorreu por 90 minutos a 37°C e o crescimento por 48 horas nas mesmas condições. Após as higienizações, o crescimento em placas de Petri foi realizado por 24 horas também a 37°C. Os autores observaram que as duas concentrações de hipoclorito de sódio foram capazes de eliminar a viabilidade de crescimento de todos os microrganismos, pois as contagens de UFC foram nulas. O óleo de mamona apresentou resultados variados, eliminando completamente *B. subtilis*, mas ineficiente para *E. faecalis* por não apresentar diferença significativa ao controle. Para os demais microrganismos o óleo de mamona apresentou redução significativa de UFC em relação ao controle, mas sem eliminá-los como o hipoclorito. Concluíram que as concentrações do hipoclorito de sódio no tempo de imersão constituem método eficaz de eliminar microrganismos em resina acrílica e que o óleo de mamona tem ação moderada e variada dependendo do microrganismo.

Duyck et al., 2016, avaliaram o nível de higienização obtido em próteses frente a diferentes combinações de higienização mecânica e acondicionamento noturno. Os métodos avaliados foram escovação + imersão noturna em água sem higienizador, escovação + imersão noturna em água com higienizador, ultrassom + imersão em água sem higienizador e ultrassom + imersão em água

com higienizador. Cada método foi realizado por 5 dias consecutivos e foram 4 coletas de biofilme por prótese que ocorreram na mesma região, antes e após o experimento, avaliando 20 tipos de bactérias e também *C. albicans*, além da avaliação de quantidade de biofilme evidenciado. O estudo contou com 13 pacientes que participaram dos 4 métodos experimentais propostos. O higienizador utilizado foi o Corega anti-bactéria - tablete higienizador de prótese® da GSK (Stafford Miller, Irlanda) que apresentava basicamente a liberação de peróxido de hidrogênio, com enzima e ácido cítrico. Os resultados indicaram redução geral e significativa de bactérias com a associação de um higienizador ao período noturno, sendo que com o ultrassom essa redução foi ainda maior que com a escovação. As bactérias foram avaliadas ainda conforme seu agrupamento, por coloração, e individualmente. Os autores observaram redução significativa nos agrupamentos de coloração verde e roxa quando do uso de higienizador, da mesma forma observaram a redução nas cepas específicas de *Capnocytophaga spp*, *Campylobacter concisu*, *Streptococcus milleri*, *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. Para a *C. albicans*, porém, os autores não observaram diferenças significativas. Ao compararem os métodos mecânicos entre si, verificaram que não houve diferença de quantidade ou qualidade do biofilme bacteriano. Em relação à presença de biofilme, nenhuma prótese ficou isenta e nenhum método utilizado proporcionou alterações significativas na sua evidenciação. Os autores concluíram que o armazenamento noturno de prótese em água com higienizador pode reduzir a quantidade e alterar a composição do biofilme bacteriano, porém, sem efeitos sobre a *C. albicans*.

Moffa et al., 2016, avaliaram o efeito antimicrobiano de diferentes métodos de higienização em próteses totais reembasadas. Para isso, 45 usuários de prótese total, com necessidade de reembasamento das próteses, foram divididos em 3 grupos e os métodos de higienização foram: Grupo controle (GC) Escovação da prótese com sabão de côco e escova macia 3 vezes ao dia por 6 meses, grupo perborato (GP) que, além dos procedimentos do GC, realizaram uma imersão diária da prótese, por 5 minutos, em água com uma pastilha de Corega Tabs® e grupo clorexidina (GCLX) que, além dos procedimentos de GC, utilizaram digluconato de clorexidina a 2% uma vez ao

dia por 5 minutos. Além da eficiência higienizadora, os autores também coletaram dados da rugosidade da superfície obtida com o material reembasador, para verificar se a rugosidade causaria interferência nos resultados microbiológicos. As coletas de biofilme ocorreram na superfície interna da prótese (superfície reembasada) no dia zero, considerado após 48 horas do reembasamento, e nos dias 7, 15, 30, 90 e 180 do experimento, para contagem de UFC de microrganismos totais. Os resultados mostraram que os 3 grupos apresentaram redução significativa de microrganismos do tempo zero ao 7º dia, porém sem diferenças entre si. Além disso, os autores consideraram que essa redução verificada no 7º dia não foi clinicamente relevante, pois as leituras obtidas foram consideradas altas. Nas leituras do 15º dia em diante não houve diferença significativa no GC, mas os outros grupos zeraram a contagem de UFC, demonstrando eficiência dos dois métodos na redução de microrganismo, tanto em relação ao GC como às leituras de tempo zero e 7º dia. Em relação à rugosidade, não observaram diferenças entre os grupos, mas, independentemente do grupo, verificaram redução significativa da rugosidade a partir da leitura do 30º dia.

Izumi et al., 2016, avaliaram a possibilidade da utilização de ácidos orgânicos, normalmente encontrados em alimentos humanos, para higienização de próteses. Para esse experimento utilizaram métodos *in vitro* e também *in vivo*. A solução de ácidos orgânicos foi composta basicamente por ácido cítrico e ácido láctico. Na etapa *in vitro* do experimento foram confeccionados 135 corpos de prova de resina acrílica e foram inoculados: *S. sanguinis*, *S. pneumoniae* e *C. albicans* em cada grupo. Os métodos de higienização avaliados foram: grupo controle composto apenas de água, higienizador à base de peróxido alcalino (Polident®) e o grupo da solução de ácidos orgânicos. Os períodos de imersão avaliados foram de 5 minutos, 30 minutos e 8 horas para todos os grupos. Na parte *in vivo* do experimento foram utilizados 60 pacientes usuários de prótese total. Houve coleta de material antes e após os processos de higienização, que contaram com os mesmos métodos citados, porém, pelo período de imersão único de 10 minutos. Para leituras tanto dos experimentos *in vitro* como *in vivo* utilizaram a contagem de UFC. Os resultados *in vitro* mostraram redução significativa de *S. sanguinis* e

S. pneumoniae tanto para solução de ácidos orgânicos e Polident® em relação ao controle, nos 3 tempos avaliados, mas sem diferenças significativas entre si. Para *C. albicans* também houve redução significativa, nos 3 tempos, comparando os dois tipos de higienizadores e o controle, e também uma diferença significativa entre a solução de ácidos orgânicos e o Polident®, que foi mais eficiente, também nos 3 tempos avaliados. No resultado in vivo, que avaliou a quantidade total de microrganismos, os autores verificaram redução significativa nos dois métodos de higienização utilizados em relação ao grupo controle, mas não entre os métodos em si. Os autores concluíram que ácidos orgânicos podem atingir níveis de higienização tão altos quanto os higienizadores comerciais, e que poderiam ser utilizados como higienizadores químicos de próteses.

Coimbra et al., 2016, avaliaram o efeito de diferentes higienizadores em diferentes microrganismos, utilizando corpos de prova de resina acrílica em forma de disco (15 mm de diâmetro x 3 mm de espessura). Foram utilizados os seguintes microrganismos: *C. albicans* (Ca), *C. glabrata* (Cb), *S. aureus* (Sa), *S. mutans* (Sm), *B. subtilis* (Bs), *E. faecalis* (Ef), *E. coli* (Ec) e *P. aeruginosa* (Pa) e os higienizadores à base de peróxido alcalino: Nitradine® Medical Interporous® (MI), Efferdent Plus® (EF) e Corega Tabs (CT), além de grupo controle positivo (CP) sem higienizador e um grupo controle negativo (CN) sem inoculação de microrganismos. Os corpos de prova foram esterilizados e inoculados, com 1 hora e 30 minutos de adesão e 48 horas de crescimento, com os microrganismos específicos. Para a higienização cada pastilha efervescente foi dissolvida em 200 mL de água destilada estéril nos seguintes tempos: 15 minutos para MI e EF e 5 minutos para CT, conforme instruções dos fabricantes. O grupo CP foi imerso em PBS estéril sem higienizador, por 15 minutos. O grupo CN passou por todas as etapas, exceto inoculação de microrganismos e higienizadores, sendo também imerso em PBS estéril por 15 minutos. A eficiência antimicrobiana foi medida a partir da contagem de UFC. Os resultados demonstraram eficiência significativa na redução de UFC em *C. albicans* apenas com MI, para *C. glabrata* essa redução foi obtida com EF e MI. Os autores verificaram redução significativa de *S. aureus* com CT e MI, *S. mutans* com MI e EF, *B. subtilis* com MI e CT e *E. faecalis* com MI e EF.

Relacionaram a alta eficiência de MI à presença do lauril sulfato de sódio associado ao Nitradine®, assim como associaram a eficiência intermediária de CT às leveduras devido à associação do lauril sulfato de sódio com o perborato de sódio. Também colocaram a presença do EDTA como importante componente nos resultados obtidos por MI e EF. Concluíram que o mais eficiente foi o higienizador MI, pois promoveu redução significativa de todos os microrganismos.

A revista de literatura não demonstra estudos da ação antimicrobiana de peróxidos alcalinos em biofilmes formados exclusivamente em superfície metálica, assim como não existe, a partir dos trabalhos levantados, um padrão de ação ou um protocolo eficaz definido para utilização dos peróxidos alcalinos em higienização de próteses, especialmente em Prótese Parcial Removível.

3. Proposição

A proposta desse trabalho foi avaliar, por meio de contagem microbiana, o efeito de 5 marcas de pastilhas higienizadoras à base de peróxido alcalino, Polident 3 min.®, Polident for Partial®s, Efferdent®, Steradent® e Corega tabs®, na desinfecção de corpos de prova de uma liga de Cobalto-Cromo (Co-Cr) contaminados por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

4. Material e método

Delineamento experimental

Para verificar a ação antimicrobiana de higienizadores à base de peróxido alcalino na liga de Co-Cr, foram definidos dois fatores de variação: Cepas microbianas, sendo duas leveduras e duas bactérias, divididas em 4 níveis: *Candida albicans* (Ca), *Candida glabrata* (Cg), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Streptococcus mutans* (Sm) e Higienizadores (H), em 6 níveis: H1. Água deionizada (controle positivo), H2. Polident 3 minutes®, H3. Polident for partials®, H4. Efferdent®, H5. Steradent® e H6. Corega Tabs®. Foi estabelecido também um grupo controle negativo, com 6 espécimes por microrganismo, utilizado para atestar a esterilidade do corpo de prova e do meio de cultura. Os subgrupos do controle negativo não passaram pelos processos de contaminação, higienização ou imersão (Figura 1). Desta forma, a amostra do experimento foi composta por 264 corpos de prova, com 24 grupos experimentais (n=10) e 4 controles negativos (n=6), um para cada grupo de microrganismo.

Figura 1: Controle negativo sem crescimento de microrganismos.

Obtenção dos corpos de prova em Co-Cr

Para confecção dos corpos de prova (CP) foram obtidos padrões de cera (GEO, Renfert GmbH, Hilzingen, Alemanha) em forma de discos de 12 mm de diâmetro e 3 mm de espessura, em uma matriz de latão desenvolvida na Oficina do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP. A cera foi liquefeita em plastificador elétrico (BRAVAC, São Paulo, SP, Brasil) com temperatura média de 80°C e vertida com conta-gotas no interior da matriz

(Figura 2). Aguardou-se a solidificação da cera e os excessos foram removidos com auxílio de espátula de aço temperado de 8 cm (Dexter, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3) de forma que o orifício ficasse totalmente preenchido sem excessos ou falhas de material. A espátula aquecida foi utilizada sobre a superfície já acabada e nivelada para melhorar sua lisura (Figura 3) obtendo assim o completo preenchimento da matriz sem excessos ou menisco (Figura 4). Os padrões de cera foram alocados em recipiente plástico com água para evitar deformação e posteriormente levados à fundição.

Figura 2: Cera liquefeita na matriz metálica.

Figura 3: Acabamento com espátula.

Figura 4: Aspecto final da matriz preenchida.

Para cada anel de fundição foram posicionados 5 padrões de cera por anel de fundição, unidos ao seus canais de alimentação (Cerafix Manufatura e Comércio de Ceras para Moldes Ltda, Pradópolis, SP, Brasil) (Figura 5) com câmaras de compensação de tamanho grande, de maneira equidistante em uma base formadora de cadinho (Figura 6), e aplicado agente anti-bolhas

(Silikon & Wachs, Entspannen, Alemanha). Os padrões de cera foram incluídos em revestimento fosfatado Micro Fine 1700 (Talladium do Brasil, Curitiba, PR, Brasil), manipulado a vácuo (Espatuladora A300, Polidental, São Paulo, SP, Brasil) na seguinte proporção: 180 g de pó, 32 mL de líquido e 12 mL de água destilada. Os moldes de material refratário foram levados ao forno Edgcon 5P (EDG, São Carlos, SP, Brasil) e submetidos a ciclos térmicos para a expansão do revestimento e eliminação da cera. O ciclo de aquecimento dos moldes foi realizado da seguinte maneira: aquecimento à velocidade de 15°C/min da temperatura ambiente até 300°C, permanecendo nesta temperatura por trinta minutos; aquecimento de 15°C/min até 950°C, permanecendo nesta temperatura por vinte minutos; resfriamento de 15°C/min até 900°C, permanecendo nesta temperatura por sessenta minutos.

Figura 5: Padrões de cera e canais de alimentação.

Figura 6: Posicionamento em base formadora de cadinho.

Os moldes foram posicionados na máquina eletrônica de fundição por indução Neutrodyn Easyti (F.Lli Manfredi, Torino, Itália) (Figura 7) a vácuo, com padronização da temperatura em 1380°C e torque da centrífuga constante. Foram utilizados 3 lingotes de liga metálica de Co-Cr (Degudent GmbH, Hanau, Alemanha) para fundição e injeção em cada molde.

Após resfriamento dos anéis, as fundições foram desincluídas e jateadas com óxido de alumínio de granulação de 100 μm (Aluminum Oxide 100; Asfer Chemical Industry, São Caetano do Sul, Brasil), sob pressão de 3 bar, por cinco segundos, no Microjet III (EDG, São Carlos, SP, Brasil) para remoção dos excessos de revestimento (Figura 8). Depois de recortados e separados dos canais de alimentação com discos de carborundum, os discos foram submetidos ao acabamento e polimento.

Figura 7: Máquina de fundição.

Figura 8: Remoção do revestimento.

Acabamento e polimento dos corpos de prova

A superfície lateral do corpo de prova recebeu acabamento com disco de carborundum e borracha de polimento na politriz Standard (Kota equipamentos, Cotia, SP, Brasil) (Figura 9). As superfícies opostas dos discos metálicos foram submetidas ao acabamento e polimento com lixas d'água de granulação 220, 400, 600 e 1200 (Norton Abrasivos, Saint-Gobain, França) na politriz AROPOL-E (AROTEC, Cotia, SP, Brasil) (Figura 10) em um dispositivo com capacidade para 6 discos metálicos. Os discos foram apreendidos por suportes de resina acrílica confeccionados na Oficina de Precisão do Departamento de Materiais

Dentários e Prótese da FORP USP (Figura 11). Estes suportes de resina acrílica se adaptavam aos orifícios do dispositivo de polimento automático da politriz e recebiam a carga axial padronizada e constante durante a ação das lixas. Todo o processo foi realizado com água corrente sobre a superfície abrasiva das lixas. O acabamento final foi realizado manualmente na lixa 1200 com a finalidade de eliminar rugosidades criadas no acabamento obtido por meio da politriz automática, homogeneizando a superfície do disco metálico. Após o uso de cada lixa, os discos metálicos foram lavados em água corrente a fim de remover qualquer partícula de metal ou grânulos das lixas utilizadas antes de passar à próxima lixa.

Figura 9: Acabamento lateral.

Figura 10: Acabamento diametral.

Figura 11: Suportes de resina acrílica.

Finalizado o processo de acabamento e polimento, que conferiu às faces opostas (diametraais) o intervalo de rugosidade entre $0,04 \mu\text{m}$ e $0,11 \mu\text{m}$, conferido em rugosímetro de superfície (Surftest SJ-201P, Mitutoyo Corporation, Japão) (Figura 12), todos os discos metálicos foram limpos com gaze e álcool para remoção de resíduos e oleosidade.

Figura 12: Rugosímetro de superfície.

Esterilização dos corpos de prova

Os corpos de prova foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 10. Foram embalados em papel grau cirúrgico em subgrupos de 5, para posterior esterilização. A esterilização foi realizada com óxido de etileno pela empresa ACECIL (Campinas, Brasil).

Cepas microbianas

Foram selecionadas quatro cepas microbianas (Quadro 1), cujos microrganismos são comumente encontrados em próteses dentárias e cavidade bucal (Powell et al., 1990; Pavarina et al., 2003; Salerno et al., 2011; Williams et al., 2011; Lucena-Ferreira et al., 2013; Kiesow et al., 2015). O preparo do inóculo microbiano e as semeaduras ocorreram com meios de cultura específicos para cada cepa microbiana.

Quadro 1 - Cepas microbianas utilizadas

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

Candida albicans* e *Candida glabrata

Foi utilizado o meio Sabouraud Dextrose Broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia) para preparação do inóculo fúngico e contaminação dos corpos de prova, por 48 hrs em agitação e sob 37°C, com *C. albicans* e *C. glabrata*. Para cada 30 g do meio de cultura desidratado foram adicionados 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, seguindo instruções do fabricante do meio.

Para semeadura da suspensão obtida após imersão dos corpos de prova contaminados com *C. albicans* e *C. glabrata* nas soluções higienizadoras foi utilizado o meio Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia). Para cada 65 g do meio de cultura desidratado foram adicionados 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, seguindo instruções do fabricante.

Streptococcus mutans

Foi utilizado o meio Brain Heart Infusion (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia) para preparação do inóculo bacteriano e contaminação dos corpos de prova, por 48 hrs em agitação e sob 37°C, com *S. mutans*. Foram adicionadas 52 g do meio desidratado em 1000 mL de água destilada e o inóculo foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos conforme orientação do fabricante do meio.

Para semeadura da suspensão obtida após imersão dos corpos-de-prova, contaminados com *S. mutans*, nas soluções higienizadoras foi utilizado o meio Brain Heart Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia). Para cada 37 g do meio de cultura desidratado foram adicionados 1000 mL de água destilada e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Staphylococcus aureus

Foi utilizado o meio Mueller Hinton Broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, MH, Índia) para preparação do inóculo bacteriano e contaminação dos corpos de prova, por 48 hrs em agitação e sob 37°C, com *S. aureus*. Para cada 21 g do meio de cultura desidratado foram adicionados 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, seguindo instruções do fabricante do meio.

Para semeadura da suspensão, obtida após imersão dos corpos de prova contaminados com *S. aureus* nas soluções higienizadoras, foi utilizado o meio Mueller Hinton Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, MH, Índia). Para cada 38 g do meio de cultura desidratado foram adicionados 1000 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, seguindo instruções do fabricante do meio.

Meio de cultura Letheen Broth

Este meio de cultura foi utilizado após a higienização dos corpos de prova, a fim de inativar possíveis resíduos dos higienizadores. As semeaduras em placas de petri foram realizadas a partir de alíquotas das suspensões obtidas neste meio. Também foi utilizado na avaliação de esterilidade a partir da observação da turvação ou não (esterilidade) do meio. Para cada 25,7 g do meio de cultura desidratado Letheen Broth (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA) foram adicionados 1000 mL de água destilada e 5 g de Tween 80 (Liofilchen, PE, Itália). O meio de cultura esterilizado foi distribuído em alíquotas de 10 mL para cada tubo de ensaio de polipropileno, com tampa rosqueável, estéreis (Techno Plastic Products - TPP, Trasadingen, Cantão Schaffhausen, Suíça).

Avaliação da Ação Antimicrobiana

Diluição dos microrganismos e inoculação do meio de cultura

Os microrganismos foram descongelados e reativados, nos meios de cultura sólidos anteriormente descritos, por 48 hs. Uma colônia foi transferida para o respectivo caldo, seguindo incubação a 37°C por 24 hs. As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. O *pellet* resultante foi lavado duas vezes em PBS (Phosphate Buffered Saline). Para determinação da concentração celular, os procedimentos foram realizados da seguinte forma:

Para as leveduras foi utilizada a câmara de Neubauer (Figura 13), pois devido à morfologia variável, especialmente da *C. albicans*, o espectrofotômetro não propicia precisão adequada. A câmara de Neubauer consiste em uma lâmina grossa para uso em microscópio ótico, possui depressão no centro e duas câmaras, com linhas perpendiculares dividindo essas câmaras em quadrantes. Cada quadrante é destinado à contagem, por unidade de volume de uma suspensão, de células de acordo com seu tamanho, sendo que o quadrante de maior divisão, destinado às maiores células, é onde se contam as leveduras. Como o volume de cada quadrante é conhecido, 0,0001 mL, a contagem de células torna-se viável. A partir de 10 µL de suspensão da levedura observada ao microscópio na câmara de Neubauer, obtém-se o número total nos 4 quadrantes periféricos e calcula-se a concentração de microrganismos da seguinte forma:

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

Onde:

N: número total de células

C: Contagem de células nos 4 quadrantes periféricos

D: Diluição utilizada

A inoculação do meio de cultura foi realizada, obtendo-se uma concentração de 1×10^6 células/mL. Esses valores foram confirmados em semeadura em placa de Petri.

Figura 13: Câmara de Neubauer.

Para as bactérias foi utilizado um espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, MA, EUA) (Figura 14). Uma cubeta, recipiente específico para o espectrofotômetro, com 1 mL de PBS estéril, foi colocada na máquina para calibragem da absorbância zero. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 625 nm. Após a calibragem, a mesma quantidade de suspensão bacteriana em PBS, foi colocada no espectrofotômetro, no mesmo tipo de cubeta, e novamente efetuada leitura no comprimento de onda citado. Devido à turvação da suspensão, consequência da diluição do microrganismo, houve absorbância maior que o PBS da calibragem, onde a leitura da absorbância entre 0,07 a 0,08 foi obtida para *S. aureus* e de 0,09 a 0,095 para *S. mutans*, representando a concentração de 10^8 UFC/mL desejada. Esses valores foram confirmados em semeadura em placa de Petri. A inoculação do meio de cultura foi realizada obtendo-se uma concentração de 1×10^6 células/mL.

Figura 14: Espectrofotômetro.

Contaminação e incubação dos corpos de prova

Todo processo descrito a seguir foi realizado em duplicidade na mesma semana, iniciando um dia com 5 espécimes e no outro mais 5 espécimes, totalizando 10 espécimes por grupo. Dessa forma procurou-se evitar que, uma eventual contaminação ou imprevisto compromettesse todo o experimento, além de proporcionar a verificação da reprodutibilidade. Em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, SP, Brasil), 5 corpos de prova de cada grupo foram distribuídos em placas para cultura de células (Techno Plastic Products- TPP, Trasadingen, Cantão Schaffhausen, Suíça), com 24 compartimentos cilíndricos cada (Figura 15).

Em cada compartimento foi colocado um espécime que recebeu 1,5 mL do meio de cultura inoculado pelo microrganismo específico conforme diluição descrita anteriormente.

Figura 15: Distribuição dos corpos de prova.

A incubação ocorreu em uma hora e trinta minutos, a 37°C, sob agitação de 75 rpm, em estufa bacteriológica (Incubadora Shaker, Mod. CE-320, CienLab, Campinas, SP, Brasil). Após esse período, o meio de cultura foi removido de cada poço e na sequência cada espécime foi lavado duas vezes com 1,5 mL de PBS estéril, no próprio poço, com a finalidade de remover os microrganismos não aderidos ou fracamente aderidos. Logo após, foram acrescentados 1,5 mL de meio de cultura estéril em cada compartimento. A incubação das placas ocorreu a 37°C, com agitação, por 48 horas, para maturação do biofilme. Após as primeiras 24 horas, foi realizada lavagem com

PBS estéril, conforme descrito anteriormente, e novamente acrescentados 1,5 mL do meio de cultura inoculado. Para o *Streptococcus mutans* o cultivo foi realizado em ambiente de microaerofilia.

Imersão nas soluções e verificação da eficácia de desinfecção

Finalizado o período de crescimento e maturação do biofilme, cada grupo foi submetido à higienização com peróxido alcalino (Quadro 2).

Quadro 2: Higienizadores utilizados.

Nome Comercial	Fabricante	Composição	Lote
Polident 3 minutes®	GlaxoSmithKline, Philadelphia, EUA	Bicarbonato de sódio, ácido cítrico, carbonato de sódio, potássio monopersulfato, perborato de sódio, benzoato de sódio, PEG-180, TAED, lauril sulfoacetato, copolímero VP / VA, aroma.	MI0313
Polident for Partials®	GlaxoSmithKline, Philadelphia, EUA	Benzoato de sódio, ácido cítrico, carbonato de sódio, potássio Monopersulfato, perborato de sódio, PEG 100, EDTA, Laurilsulfoacetato, Copolímero VP / VA, aromatizante	100062CA
Steradent®	Reckitt Benckiser Healthcare, United Kingdom.	Bicarbonato de sódio, sulfato de sódio, ácido cítrico, carbonato de sódio, carbonato de potássio, PEG-150, PEG-90, aromatizante, Perborato de Sódio, Cl 73015, Ácido málico, cocoilisetionato de sódio, glicose, cloreto de sódio.	HU87DS
Efferdent®	A Prestige Brands Company, Tarrytown, NY.	Não divulgado pelo fabricante	ED025702
Corega Tabs®	Stafford-Miller Ind., Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Bicarbonato de sódio, ácido cítrico, carbonato de sódio, persulfato de potássio, perborato de sódio, benzoato de sódio, polietilenoglicol 8000, laurilsulfoacetato de sódio, copolímero de acetato de vinil, estearato de sódio, mentol, aromatizantes e corantes: indigotina – Cl73015, azul brilhante – Cl 42090 e tartrazina – Cl 19140.	MC221424E

O processo de higienização ocorreu por imersão única de 5 minutos, onde cada pastilha higienizadora foi dispensada, para sua dissolução, em 200 mL de água deionizada estéril a 37°C e, imediatamente, ocorreu a imersão dos corpos de prova. O grupo controle positivo foi imerso apenas em água deionizada estéril nas mesmas condições para cada microrganismo.

Para proporcionar a imersão simultânea de cada grupo, os espécimes foram removidos com pinça estéril e, após drenagem do meio de cultura de cada poço, foram alocados em cestas de aço inoxidável com dimensões de 6 mm x 3 mm x 3 mm, confeccionadas na Oficina de Precisão do Campus de Ribeirão Preto da USP (Figura 16) com 6 divisões cada.

Figura 16: Cesta de inox.

O dispositivo possui uma alça e suporte, que permitiu a imersão sem que a cesta se encostasse no fundo do recipiente e, ao mesmo tempo, os espécimes ficassem totalmente submersos e sob efeito da pastilha higienizadora que se dissolvia abaixo da cesta. Para cada microrganismo, as imersões em todas as soluções foram realizadas simultaneamente (Figura 17).

Figura 17: Higienização simultânea.

Após os 5 minutos de imersão, todos os espécimes, inclusive os do grupo controle foram imersos por mais 5 minutos em 200 mL de água deionizada estéril para remoção de resíduos das soluções higienizadoras, utilizando-se o mesmo dispositivo de aço inoxidável.

Removidos dessa imersão, com pinça estéril exclusiva para cada grupo, cada corpo de prova foi submerso e removido sequencialmente de 3 placas de Petri estéreis, exclusivas para cada grupo, com água deionizada estéril, com a finalidade de garantir a remoção total de qualquer resíduo de substâncias higienizadoras. Separados individualmente e identificados em tubos de polipropileno de 50 mL, com tampa rosqueável e estéreis, com 10 mL de meio Lethen Broth estéril, todos foram levados ao ultrassom (Altsonic, Clean 9CA, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20 minutos, com a finalidade de obter desprendimento dos microrganismos do espécime metálico. Aliquotas da suspensão obtida foram semeadas em placas de Petri nas diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , para posterior determinação da quantidade de unidade formadoras de colônias (UFC/mL). As diluições foram obtidas com PBS estéril, onde 25 μ L da solução original (10^0) foram diluídos em 225 μ L de PBS estéril obtendo a diluição 10^{-1} , para, da mesma forma, obter-se a diluição 10^{-2} e a partir dessa última, a diluição 10^{-3} . Após esses procedimentos realizou-se incubação por 24 horas, a 37°C, sem agitação. Para o grupo do *Streptococcus mutans* o período de incubação foi de 48 horas devido à necessidade de colônias maiores para

possibilitar a leitura, além da necessidade de um ambiente de microaerofilia (Figura 18).

Figura 18: Placas com *S. mutans* em microaerofilia.

Após a incubação, o número de colônias obtido da semeadura de cada diluição de cada corpo de prova foi contado, e os valores de UFC/ml calculados, por meio da fórmula:

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

Nessa formula considerou-se:

Nº de colônias: A maior leitura obtida até 300 colônias

n: valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3) da qual o número de colônias foi considerado;

q: quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando da semeadura.

Os tubos de ensaio com meio Letheen Broth de cada espécime foram mantidos em estufa, também a 37°C, até turvação do meio. Caso essa turvação não ocorresse no mesmo período da incubação das placas, os tubos que não turvaram deveriam permanecer na estufa até a turvação, por no máximo 28 dias, o que não foi necessário, pois todos turvaram no mesmo período da incubação das placas, exceto o controle negativo.

Análise estatística

A partir dos valores de UFC/mL foram calculados os valores de $\log_{10}(\text{UFC}+1)$. Os dados obtidos foram então submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar como se apresentava sua distribuição. Para o grupo do microrganismo *Streptococcus mutans* foi observada distribuição normal. Desta forma, seus dados foram submetidos à estatística paramétrica, com aplicação da Análise de Variância (ANOVA) e *post test* de Tukey. Para os demais microrganismos, como os dados apresentaram distribuição não-normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post test* de Dunn. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 0,05.

5. Resultados

Análise de esterilidade

A Tabela 1 apresenta os resultados da turvação dos meios de cultura dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após a imersão e posterior incubação.

Tabela 1 – Turvação dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após a imersão em soluções à base de peróxidos alcalinos e incubação.

Grupos	Ca	Cg	Sa	Sm
Polident 3 minutes®	+	+	+	+
Polident for Partials®	+	+	+	+
Efferdent®	+	+	+	+
Steradent®	+	+	+	+
Corega Tabs®	+	+	+	+
Controle positivo	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-

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

Análise antimicrobiana

As Tabelas 2 a 5 apresentam os resultados (UFC/mL) de cada cepa microbiana avaliada em $\log_{10}(\text{UFC}+1)$.

As Figuras 19 a 22 mostram placas com crescimento das colônias microbianas obtidas para leitura e cálculo das UFC.

Tabela 2 – *Candida albicans* - Total de UFC/mL, em $\log_{10}^{(\text{UFC} + 1)}$

Espécimes	Polident 3 minutes®	Polident for Partials®	Efferdent®	Steradent®	Corega Tabs®	Controle
1	3,33	2,38	2,83	3,41	2,94	4,33
2	0	4,40	2,92	3,03	3,05	3,58
3	3,38	3,86	0	2,45	4,44	2,83
4	3,35	3,26	2,64	2,68	4,50	4,51
5	1,61	2,86	3,30	2,08	2,21	2,83
6	0	1,91	1,61	4,28	2,78	2,38
7	2,51	0	2,08	1,91	3,05	2,51
8	2,08	3,68	2,08	4,68	3,18	2,30
9	2,72	2,30	0	2,38	0	2,56
10	2,38	1,61	2,08	2,92	3,19	3,68

Figura 19: Crescimento de *Candida albicans*.

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

Espécimes	Polident 3 minutes®	Polident for Partials®	Efferdent®	Steradent®	Corega Tabs®	Controle
1	4,61	4,77	2,56	3,98	3,42	4,37
2	4,79	4,70	2,83	5,00	4,23	4,76
3	4,28	3,83	3,58	4,28	4,65	5,55
4	4,47	4,50	3,65	4,50	4,75	6,04
5	4,51	3,27	4,16	4,53	3,58	5,34
6	5,51	3,77	3,78	4,53	4,51	5,38
7	4,68	4,25	3,44	5,37	3,89	5,44
8	2,08	4,53	3,22	4,84	3,77	5,26
9	4,33	4,73	4,32	5,83	4,45	5,83
10	3,94	4,90	4,26	5,37	4,52	5,75

Figura 20: Crescimento de *Candida glabrata*.

Tabela 4 – *Staphylococcus aureus* - Total de UFC/mL, em $\log_{10}^{(UFC + 1)}$

Espécimes	Polident 3 minutes®	Polident for Partials®	Efferdent®	Steradent®	Corega Tabs®	Controle
1	2,68	5,97	4,52	5,41	5,30	6,91
2	6,03	3,62	6,40	6,31	7,00	0,00
3	4,99	6,54	5,75	2,98	6,33	6,89
4	4,91	5,55	4,74	2,30	4,81	6,55
5	4,45	6,54	5,61	2,08	3,87	6,66
6	6,49	5,33	4,88	4,62	5,19	6,64
7	5,72	4,73	4,92	3,65	4,52	7,08
8	6,34	3,44	5,96	5,49	5,82	5,96
9	6,37	4,89	4,57	5,93	5,61	7,02
10	5,39	5,26	5,76	2,88	6,34	6,86

Figura 21: Crescimento de *Staphylococcus aureus*.

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

Espécimes	Polident 3 minutes®	Polident for Partials®	Efferdent®	Steradent®	Corega Tabs®	Controle
1	4,31	2,78	4,32	3,86	4,43	5,73
2	4,29	4,88	4,80	5,07	3,84	5,62
3	3,13	3,89	3,99	4,33	4,05	5,97
4	4,37	4,57	5,33	4,21	4,69	4,65
5	4,07	2,68	4,65	2,21	4,70	4,81
6	4,19	1,61	4,82	3,84	3,92	4,42
7	5,39	2,98	3,64	2,56	3,90	6,03
8	3,35	3,20	4,25	3,08	3,48	5,11
9	4,34	3,75	4,19	2,08	4,35	4,54
10	4,89	1,61	4,68	1,91	3,76	3,87

Figura 22: Crescimento de *Streptococcus mutans*.

Análise estatística

As Tabelas 6 a 9 apresentam os resultados da análise estatística para *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Tabela 6 – UFC/mL em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$ - Medianas e intervalo de confiança em 95% relativos à *C. albicans*.

Grupos	<i>C. albicans</i>
Polident 3 minutes®	2,45 (1,23 a 3,04)
Polident for Partial®	2,62 (1,71 a 3,74)
Efferdent®	2,08 (1,14 a 2,77)
Steradent®	2,80 (2,33 a 3,63)
Corega Tabs®	3,05 (2,04 a 3,83)
Controle	2,83 (2,57 a 3,73)
Kruskal-Wallis	p=0,15

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, não houve diferença estatisticamente significativa para redução do número de UFC de *C. albicans* entre os grupos avaliados.

Tabela 7 – UFC/mL em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$ - Medianas e intervalo de confiança em 95% relativos à *C. glabrata*.

Grupos	<i>C. glabrata</i>
Polident 3 minutes®	4,49 (3,69 a 4,95) ^{abc}
Polident for Partial®	4,52 (3,94 a 4,71) ^{abc}
Efferdent®	3,62 (3,16 a 4,00) ^c
Steradent®	4,69 (4,42 a 5,23) ^{ab}
Corega Tabs®	4,34 (3,84 a 4,52) ^{bc}
Controle	5,41 (5,02 a 5,73) ^a
Kruskal-Wallis	p=0,00

^{abc} Letras diferentes indicam diferenças significativas (p = 0,05) no *post test* de Dunn

Segundo o teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn, houve diferença significativa entre os grupos, com redução significativa do número de UFC de *C. glabrata* quando utilizadas as pastilhas de Efferdent® e Corega Tabs® quando comparadas ao grupo controle. Houve também diferença estatisticamente significativa entre Efferdent® e Steradent®.

Tabela 8 – UFC/mL em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$ - Medianas e intervalo de confiança 95% relativos ao *S. aureus*.

Grupos	<i>S. aureus</i>
Polident 3 minutes®	5,56 (4,51 a 6,17) ^{ab}
Polident for Partials®	5,30 (4,42 a 5,95) ^{ab}
Efferdent®	5,27 (4,84 a 5,78) ^{ab}
Steradent®	4,14 (3,04 a 5,29) ^b
Corega Tabs®	5,46 (4,80 a 6,15) ^{ab}
Controle	6,76 (4,52 a 7,60) ^a
Kuskal-Wallis	p=0,006

^{ab} Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p = 0,05$) no *post test* de Dunn

Conforme teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn, houve diferença significativa entre os grupos, com redução significativa do número de UFC de *S. aureus* quando utilizado Steradent® comparativamente ao grupo controle. Entre os demais grupos, não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 9 – UFC/mL em $\log_{10}(\text{UFC} + 1)$ – Médias amostrais calculadas relativas ao *S. mutans*.

Grupos	<i>S. mutans</i>
Polident 3 minutes®	4,23 (0,65) ^{ab}
Polident for Partial®	3,19 (1,10) ^b
Efferdent®	4,47 (0,49) ^a
Steradent®	3,32 (1,09) ^b
Corega Tabs®	4,11 (0,41) ^{ab}
Controle	5,07 (0,74) ^a
ANOVA	p=0,00

^{ab} Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p = 0,05$) no *post test* de Tukey

De acordo com a ANOVA e *post test* de Tukey, houve diferença significativa entre os grupos, com redução significativa do número de UFC de *S. mutans* com Polident for Partial® e Steradent® quando comparados ao grupo controle e Efferdent. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos.

6. Discussão

A hipótese nula, que a contagem microbiana não seria influenciada pela ação das pastilhas efervescentes avaliadas, foi suportada parcialmente pelos resultados desse trabalho, pois não se observou nenhuma ação significativa dos higienizadores na contagem de UFC de *Candida albicans*, mas houve ação de alguns nos demais microrganismos.

A perda dental continua ocorrendo em indivíduos de diversas idades, associada a fatores como cáries e doenças periodontais, proporcionando a necessidade de reabilitação de diferentes casos clínicos (Jeyapalan, Krishnan, 2015). Vários fatores ainda colocam a PPR como a melhor indicação para determinados casos de reabilitação bucal (Budtz-Jørgensen, 1996), inclusive a escolha do paciente (Bezzon et al., 2008). O fato é que próteses removíveis, sejam parciais ou totais, proporcionam grande recobrimento da mucosa do paciente e podem servir de verdadeiros reservatórios de microrganismos, que favorecem patologias orais e sistêmicas (Figueiral et al., 2007; Preshaw et al., 2011; Salerno et al., 2011; Li et al., 2012; Nishi et al., 2012). A contaminação cruzada também é uma realidade, que tem na desinfecção a melhor forma de prevenção (Powell, 1990; Pavarina et al., 2003; Orsi et al., 2010 ; Williams et al., 2011).

É evidente a necessidade de sempre buscar a melhor higienização de todo tipo de prótese removível, considerando ainda que a PPR é uma prótese constituída basicamente por uma estrutura metálica, normalmente de liga de Co-Cr, e resina acrílica termopolimerizável. De Souza et al. (2009) enfatizaram a importância da realização de mais estudos referentes à higienização de PPR.

Considerando os métodos químicos de higienização, que podem ou não estar associados à escovação, observa-se na literatura grande enfoque ao uso do hipoclorito de sódio (Pavarina et al., 2003; Dikbas et al., 2006; de Souza et al., 2009; Orsi et al., 2010; Vieira et al., 2010; Rossato et al., 2011; de Freitas Fernandes et al., 2011; Pellizzaro et al., 2012; de Sousa Porta et al., 2013; Kiesow et al., 2015; Salles et al., 2015), entretanto, muitos autores ressaltam que pode ser prejudicial às estruturas metálicas (Keyf , Güngör, 2003; de Souza et al., 2009; Peracini et al., 2010; Felipucci et al., 2011a,b), uma vez que é passível de desencadear oxidação (Mcgowan et al., 1988; Kiesow et al.,

2015). Outras substâncias químicas avaliadas como clorexidina, enxaguatórios bucais, pastilhas higienizadoras à base de peróxidos, enzimas, ácidos e também soluções derivadas do óleo de mamona (Nikawa et al., 1995; Nikawa et al., 1999; Pavarina et al., 2003; Keyf, Güngör, 2003; Garcia et al., 2004; Dikbas et al., 2006; Paranhos et al., 2009; de Souza et al., 2009; Uludamar et al., 2010; Peracini et al., 2010; Silva-Lovato et al., 2010; Orsi et al., 2010; Salerno et al., 2011; Rossato et al., 2011; Felipucci et al., 2011a,b; Pellizzaro et al., 2012; Davi et al., 2012; Nishi et al., 2012; Lucena-Ferreira et al., 2013; Faot et al., 2014; Kiesow et al., 2015; Salles et al., 2015; Duyck et al., 2016; Izumi et al., 2016) evidenciam que estudos de substâncias alternativas ao hipoclorito de sódio têm sido desenvolvidos.

Diversos autores avaliaram a eficiência antimicrobiana de higienizadores à base de peróxido em resina acrílica (Drake et al., 1992; Paranhos et al., 2009; Uludamar et al., 2010; Silva-Lovato et al., 2010; Rossato et al., 2011; Pellizzaro et al., 2012; de Sousa Porta et al., 2013; Faot et al., 2014; Duyck et al., 2016; Izumi et al., 2016; Coimbra et al., 2016), mas não foram encontrados estudos *in vitro* da ação de peróxidos alcalinos em biofilmes desenvolvidos exclusivamente em superfícies metálicas, apenas análises *in vivo*, como de Pavarina et al. (2003) e Figueiral et al. (2007), que utilizaram pacientes de PPR e de PT, mas sem comparar os resultados de acordo com o tipo de prótese do paciente, ou ainda o trabalho de Lucena-Ferreira et al. (2013) que avaliaram exclusivamente usuários de PPR. Encontram-se também trabalhos que verificaram os efeitos adversos desses higienizadores na superfície de metais, mas sem análise da ação antimicrobiana (Keyf, Güngör, 2003; Garcia et al., 2004; Felipucci et al., 2011a,b; Davi et al., 2012).

As pastilhas higienizadoras à base de peróxidos alcalinos também têm a vantagem da facilidade de uso (Keyf, Güngör, 2003), e fazem parte de muitos trabalhos, contudo, vários autores estudaram uma única marca de peróxido (Pavarina et al., 2003; Keyf, Güngör, 2003; Paranhos et al., em 2007; Paranhos et al., 2009; Rossato et al., 2011; Lucena-Ferreira et al., 2013; Duyck et al., 2013; Kiesow et al., 2015; Moffa et al., em 2016; Duyck et al., 2016). O que se constata é que diversas marcas estão disponíveis no mercado internacional, todavia, no Brasil, somente o Corega Tabs® encontra-se acessível. Desta

forma, esse trabalho teve como objetivo verificar a ação antimicrobiana de cinco higienizadores à base de peróxido alcalino, comumente relatados na literatura, em liga de Co-Cr, contaminada com diferentes microrganismos, visando à necessidade de maior conhecimento em relação à eficiência antimicrobiana desses produtos como higienizadores de PPR.

Considerando os resultados obtidos relacionados à *C. albicans*, percebe-se que nenhum higienizador apresentou ação antimicrobiana (Tabela 6, pág.91). Tal fato é demasiadamente preocupante, uma vez que esse microrganismo é um dos principais responsáveis pela estomatite protética (Nikawa et al., 1999; Kulak-Ozkan et al., 2002; Figueiral et al., 2007; Salerno et al., 2011; Naik, Pai, 2011). Alguns achados na literatura demonstram também a ineficiência dos higienizadores à base de peróxido alcalino em trabalhos *in vitro* (Drake et al., 1992; Paranhos et al., 2009) e *in vivo* (Lucena-Ferreira et al., 2013; Duyck et al., 2016). Resultados intermediários foram observados no trabalho de Uludamar et al. (2010), que estudaram 3 marcas de higienizadores efervescentes à base de peróxido e obtiveram redução de *C. albicans* apenas com a marca Fittydent®, em 60 minutos de imersão, porém com Polident® e Efferdent® não houve redução em nenhum dos períodos estudados. Moore et al. (1984) também obtiveram resultados intermediários *in vivo*, com redução significativa dessa levedura com Mersene® e Kleenite®, mas não observaram o mesmo resultado com Efferdent® e Polident Powder®. No entanto, Vieira et al. (2010) verificaram redução significativa de *C. albicans*, em resina acrílica, pela imersão em Polident 3 minutes® por 3 minutos, e também com Efferdent® em imersão de 15 minutos, assim como de Freitas Fernandes et al. (2011) que observaram redução significativa, em resina acrílica, com Polident® em imersão de 3 minutos e Corega Tabs® em imersão de 5 minutos. Izumi et al. (2016) também constataram eficiência do Polident® para *C. albicans*, tanto na avaliação *in vitro*, em resina acrílica, em tempos de imersão de 5 minutos, 30 minutos e 8 horas, como também na avaliação *in vivo* com imersão por 10 minutos. Kiesow et al. (2015) constataram redução desse microrganismo com Polident 3 minutes triplemint®, em imersão de 5 minutos, porém os microrganismos estavam em suspensão, e não em biofilme formado na superfície de um material. Silva-Lovato et al. (2010) também descreveram

redução de *Candida spp* com Nitradine® (Medical Interporous®), que tem como base de atuação o ácido cítrico, mesmo princípio do higienizador Curaden® utilizado por Faot et al. (2014), que também propiciou redução do biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica, mas verificaram que houve recolonização após 48 horas da higienização. Portanto, pode-se observar que não há um padrão de atuação de peróxidos frente a esse microrganismo.

Adicionalmente, verifica-se que, embora alguns peróxidos possam ter apresentado ação antimicrobiana em relação à *C. albicans* em resina acrílica (Moore et al., 1984; Uludamar et al., 2010; Vieira et al., 2010; de Freitas Fernandes et al., 2011; Izumi et al., 2016), na liga metálica avaliada tal fato não aconteceu, podendo em parte ser relacionado com a diferença de material, que, segundo Li et al. (2010), pode promover diferença na formação do biofilme e na ação antimicrobiana dos higienizadores de prótese. Mas outros fatores também devem estar envolvidos, já que alguns estudos em resina também não apresentaram efetividade dos peróxidos em relação a esse microrganismo (Drake et al., 1992; Paranhos et al., 2009; Duyck et al., 2016)

De acordo com os resultados obtidos, em relação à *C. glabrata*, considerada importante levedura na estomatite protética quando associada à *Candida albicans* (Figueiral et al., 2007; Paranhos et al., 2009 e Salerno et al., 2011), apenas os higienizadores Corega Tabs® e Efferdent® apresentaram redução significativa em relação ao controle (Tabela 7, pág. 91), fato corroborado por Coimbra et al. (2016) que também constataram ação antimicrobiana do Efferdent®. Entretanto, os resultados obtidos são conflitantes com outros achados na literatura. No trabalho de Paranhos et al. (2009), o peróxido utilizado (Bonyplus®) não propiciou redução de *C. glabrata*. Vieira et al. (2010) verificaram que a imersão em Polident 3 minutes® e em Efferdent® também não propiciou redução desse microrganismo.

As leveduras estudadas apresentam evidente resistência a diversos peróxidos, sem uma relação de qual levedura é resistente a qual peróxido (Moore et al. 1984; Drake et al., 1992; Paranhos et al., 2009; Uludamar et al., 2010; Vieira et al., 2010; Lucena -Ferreira et al., 2013; Duyck et al., 2016; Coimbra et al., 2016), a outras soluções alternativas ao hipoclorito de sódio

(Salles et al., 2015) e também expressiva capacidade de recolonização, mesmo com substâncias efetivas como ácido cítrico (Silva-Lovato et al., 2010; Faot et al., 2014) ou hipoclorito de sódio, dependendo da concentração e/ou tempo de ação (McGowan et al., 1988). Portanto, microrganismos como *C. albicans* e *C. glabrata* podem apresentar comportamento variável quanto à sua redução com os higienizadores citados, e, ainda que aparentemente eliminados, são passíveis de se recolonizarem (Faot et al., 2014), evidenciando, assim, a necessidade constante de estudos que visam eliminar ou reduzir esses microrganismos.

Quando se analisam os resultados do *S. aureus*, normalmente presente em biofilme de próteses e relacionado com patologias orais e sistêmicas, além de infecção cruzada (Powell, 1990; Pavarina et al., 2003; Orsi et al., 2010; Uludamar et al., 2010; Williams et al., 2011; Nishi et al., 2012), verifica-se ação higienizadora significativa do higienizador Steradent® em relação ao controle, porém sem diferença significativa para os demais higienizadores (Tabela 8, pág. 92). Paranhos et al. (2009) também verificaram eficiência na redução com peróxido alcalino, Kiesow et al. (2015) observaram redução com Polident 3 minutes tripliment®, também com imersão de 5 minutos, porém em suspensão bacteriana, e Coimbra et al. (2016) verificaram redução significativa com imersão de 5 minutos em Corega Tabs® e de 15 minutos em Medical Interporous®. Contudo, Coenye et al. (2008) observaram ineficiência de Polident®, Steradent® e Efferdent® em biofilme de *S. aureus* em imersões de 5 minutos.

Com relação ao grupo do *S. mutans*, importante microrganismo, presente em diversos estudos levantados por Nikawa et al. (1999), e que está diretamente relacionado com a PPR e reincidência de cáries (Zlataric et al., 2002; Preshaw et al., 2011), percebe-se que houve redução do número de UFC com Polident for Partial® e Steradent® em relação ao controle (Tabela 9, pág. 93). Esse trabalho corrobora os achados de Paranhos et al. (2009), Li et al. (2010), Lucena-Ferreira et al. (2013) em trabalhos *in vivo* e Kiesow et al. (2015) em biofilme de suspensão bacteriana e não formado na superfície do material. Entretanto, Coenye et al. (2008) relataram que alguns peróxidos como Polident®, Steradent® e Efferdent® não propiciaram redução significativa de *S.*

mutans. De acordo com os resultados obtidos e relatados na literatura com peróxidos e redução de *S. mutans*, percebe-se que se trata de um microrganismo menos resistente que as leveduras, mas que nem sempre é reduzido de forma significativa e, exclusivamente, por imersão nessas soluções (Coenye et al., 2008).

As diversas formas de ação dos peróxidos alcalinos sobre microrganismos não foram completamente elucidadas na literatura em relação à sua composição. Silva-Lovato et al. (2010), Faot et al. (2014) e Izumi et al. (2016) demonstraram efetividade do ácido cítrico em relação às leveduras presentes na superfície de resina acrílica. Outro componente de diversos higienizadores é o lauril sulfato de sódio, que, segundo Dhamande et al. (2012), foi responsável pela efetividade do Clinsodent® em *C. albicans*, assim como Coimbra et al. (2016) que relacionaram essa substância com a efetividade do Medical Interporous® para *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans*, entre outros, e a eficiência intermediária de Corega Tabs® com as leveduras citadas.

Adicionalmente, o presente trabalho constatou a eficiência do Corega Tabs® apenas para *C. glabrata*, não sustentando a relação do lauril sulfato de sódio, assim como do ácido cítrico, com a eficiência desse higienizador para *C. albicans*, lembrando que os trabalhos de Dhamande et al. (2012) e Coimbra et al. (2016) realizaram seus experimentos em resina acrílica e o presente trabalho em superfície de Co-Cr. Considerando as bactérias, houve eficiência do Steradent® para *S. mutans* e *S. aureus*, do Polident for Partial® para *S. mutans*, tendo em comum o ácido cítrico e lauril sulfoacetato de sódio, presentes também no higienizador Polident 3 minutes®, assim como o ácido cítrico, mas que não foi eficaz na redução das bactérias ou leveduras. Outras substâncias, além do ácido cítrico, também são comuns aos higienizadores estudados, como carbonato de sódio e perborato de sódio, responsáveis pela liberação do peróxido de hidrogênio alcalino, detergentes, veículos, aromas e corantes.

Ainda que muitos autores e os resultados obtidos nesse trabalho evidenciem efetividade das soluções higienizadoras na redução de diversos

microrganismos, não se encontra ainda substância que seja totalmente eficiente na redução de ampla gama dos mais prevalentes na estomatite protética. Nikawa et al. (1995) afirmaram que microrganismos em biofilme são mais resistentes que em suspensão aos diferentes tipos de higienizadores, inclusive peróxidos alcalinos. Desta forma, a avaliação da ação antimicrobiana apenas em suspensão, sem formação de biofilme em superfícies, como realizado por Moore et al. (1984) e Kiesow et al. (2015), limita a discussão em relação aos resultados obtidos. Adicionalmente, os resultados aqui obtidos e de outros trabalhos *in vitro* devem ser analisados com certa ponderação, uma vez que os espécimes utilizados não reproduzem totalmente uma situação clínica de PPR, os biofilmes avaliados foram simples e não mistos e a análise foi feita somente em relação à utilização do método químico sem associação à escovação. Desta forma a transposição para a situação clínica deve ser vista com cautela.

Futuras pesquisas devem ser realizadas com o intuito de elucidar melhor a ação antimicrobiana das substâncias presentes nas fórmulas dos higienizadores, tanto em biofilmes isolados como mistos. Além disso, pesquisas clínicas com uso de higienizadores, associados ao método mecânico, e PPRs devem ser realizadas, visando maior informação a respeito da segurança de qual produto indicar para a higienização desse tipo de prótese.

7. Conclusões

Considerando as características do presente estudo e seus resultados, é possível concluir que:

1. Nenhum higienizador utilizado foi capaz de reduzir o UFC de *Candida albicans*;
2. Efferdent® e Corega Tabs® reduziram significativamente o UFC de *Candida glabrata*;
3. O higienizador Steradent® foi efetivo em relação às bactérias, mas não apresentou ação efetiva em leveduras;
4. Os peróxidos alcalinos estudados devem ser utilizados com cautela como agentes de desinfecção de estruturas de Co-Cr exclusivamente em imersões de 5 minutos, pois não apresentaram ampla ação antimicrobiana sobre todos os microrganismos avaliados.

8. Referências bibliográficas¹

¹De acordo com estilo Vancouver

1. Bezzon OL, Gonçalves M, Pagnano VO. T-Bar clasp-retained removable partial denture as an alternative to implant-based prosthetic treatment. *Braz Dent J*. 2008; 19(3): 257-262.
2. Budtz-Jørgensen E. Restoration of the partially edentulous mouth: A comparison of overdentures, removable partial dentures, fixed partial dentures and implant treatment. *J Dent*. 1996; 24(4): 237-244.
3. Coenye T, De Prijck K, De Wever B, Nelis HJ. Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *J Appl Microbiol*. 2008; 105(3):733-40.
4. Coimbra FCT, Salles MM, Oliveira VC, Macedo AP, Silva CHL, Pagnano VO, Paranhos HFO. Antimicrobial efficacy of complete denture cleansers. *Am J Dent*. 2016; 29(3), p.149-153.
5. Davi LR, Felipucci DNB, Silva RF, Bezzon OL, Lovato-Silva CH, Pagnano VO, Paranhos HFO. Effect of denture cleansers on metal ion release and surface roughness of denture base materials. *Braz Dent J*. 2012; 23(4): 387-393.
6. de Freitas Fernandes FS, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Filho AP, Straieto FG, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on *Candida spp.* biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *J Prosthet Dent*. 2011; 105(1):51-8.
7. de Sousa Porta SR, Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Del Bel Cury AA. Evaluation of sodium hypochlorite as a denture cleanser: A clinical study. *Gerodontology*. 2015; 32(4):260-6.
8. de Souza RF, De Freitas Oliveira Paranhos H, Lovato da Silva CH, Abu-Naba'a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Oct 7;(4):CD007395. doi: 10.1002/14651858.CD007395.pub2.
9. Dhamande MM, Pakhan AJ, Thombare RU, Ghodpage SL. Evaluation of efficacy of commercial denture cleansing agents to reduce the fungal biofilm activity from heat polymerized denture acrylic resin: An *in vitro* study. *Contemp Clin Dent*. 2012; 3(2):168-72.
10. Dikbas I, Koksall T, Calikkocaoglu S. Investigation of the cleanliness of dentures in a university hospital. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(3):294-8.
11. Drake D, Wells J, Ettinger R. Efficacy of denture cleansing agents in an in vitro bacteria-yeast colonization model. *Int J Prosthodont*. 1992; 5(3):214-20.
12. Duyck J, Vandamme K, Krausch-Hofmann S, Boon L, De Keersmaecker K, Jalon E, Teughels W. Impact of denture cleaning method and

- overnight storage condition on denture biofilm mass and composition: A cross over randomized clinical trial. PLoS One. 2016; 11(1):e0145837, eCollection.
13. Duyck J, Vandamme K, Muller P, Teughels W. Overnight storage of removable dentures in alkaline peroxide based tablets affects biofilm mass and composition. J Dent. 2013; 41(12):1281-9.
 14. Ercalik-Yalcinkaya S, Özcan M. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. J Prosthodont. 2015; 24(4):271-278.
 15. Faot F, Cavalcanti YW, Mendonça E, Bertolini MD, Pinto R, Da Silva WJ, Cury AA. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methyl methacrylate) effects on residual biofilm and recolonization process. BMC Oral Health. 2014; 14:77 doi: 10.1186/1472-6831-14-77.
 16. Felipucci DNB, Davi LR, Paranhos HFO, Bezzon OL, Silva RF, Barbosa Júnior F, Pagnano VO. Effect of different cleansers on the weight and ion release of removable partial denture: an *in vitro* study. J Appl Oral Sci. 2011; 19(5): 483-7. a.
 17. Felipucci DNB, Davi LR, Paranhos HFO, Bezzon OL, Silva RF, Pagnano VO. Effect of different cleansers on the surface of removable partial denture. Braz Dent J. 2011; 22(5): 392-397. b.
 18. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological predisposing factors - a large cohort. J Oral Rehabil. 2007; 34(6): 448-455.
 19. Garcia RCMR, Souza Júnior JA, Rached RN, Del Bel Cury AA. Effect of denture cleansers on the surface roughness and hardness of a microwaved-cured acrylic resin and dental alloys. J Prosthodont. 2004; 13(3):173-8.
 20. Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. J Prosthet Dent. 1990; 64(1):48-52.
 21. Izumi S, Ryu M, Ueda T, Ishihara K, Sakurai K. Evaluation of application possibility of water containing organic acids for chemical cleaning for older adults. Geriatr Gerontol Int. 2016; 16(3):300-6.
 22. Jeyapalan V, Krishnan CS. Partial edentulism and its correlation to age, gender, socio-economic status and incidence of various kennedy's classes- a literature review. J Clin Diagn Res. 2015, 9(6):14-17.

23. Keyf F, Güngör T. Comparison of effects of bleach and cleansing tablet on reflectance and surface changes of a dental alloy used for removable partial dentures. *J Biomater Appl.* 2003; 18(1):5-14.
24. Kiesow A, Sarembe S, Pizzey RL, Axe AS, Bradshaw DJ. Material compatibility and antimicrobial activity of consumer products commonly used to clean dentures. *J Prosthet Dent.* 2015; 115(2):189-198.
25. Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil.* 2002; 29(3):300-4.
26. Li L, Finnegan MB, Özkan S, Kim Y, Lillehoj PB, Ho CM, Lux R, Mito R, Loewy Z, Shi W. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. *Mol Oral Microbiol.* 2010; 25(6):384-90.
27. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent.* 2012; 40(8):686-92.
28. Lucena-Ferreira SC, Cavalcanti IMG, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers in reducing microbial counts from removable partial dentures: A short-term clinical evaluation. *Braz Dent J.* 2013; 24(4): 353-356.
29. McGowan MJ, Shimoda LM, Woosley GD. Effects of sodium hypochlorite on denture base metals during immersion for short-term sterilization. *J Prosthet Dent.* 1988; 60(2):212-8.
30. Moffa EB, Izumida FE, Jorge JH, Mussi MC, Siqueira WL, Giampaolo ET. Effectiveness of chemical disinfection on biofilms of relined dentures: A randomized clinical trial. *Am J Dent.* 2016; 29(1):15-9.
31. Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. *J Prosthet Dent.* 1984; 52(2):158-63.
32. Naik AV, Pai RC. A study of factors contributing to denture stomatitis in a north indian community. *Int J Dent.* 2011; 17(4):1 – 8.
33. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Sadamori S, Agrawal S. Cleansing efficacy of commercial denture cleansers: Ability to reduce *Candida albicans* biofilm activity. *Int J Prosthodont.* 1995; 8(6):527-34.
34. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999; 12(2):153-9.
35. Nishi Y, Seto K, Kamashita Y, Take C, Kurono A, Nagaoka E. Examination of denture-cleaning methods based on the quantity of

- microorganisms adhering to a denture. *Gerodontology*. 2012; 29(2):259-66.
36. Orsi IA, Villabona CA, Kameoka E, Ferreira MCCG, Ito IY, Saravia ME. Antimicrobial Efficacy of Chemical Disinfectants on Contaminated Full Metal Crowns. *Braz Dent J*. 2010; 21(3): 241-246.
 37. Padilha DM, Hugo FN, Hilgert JB, Dal Moro RG. Hand function and oral hygiene in older institutionalized Brazilians. *J Am Geriatr Soc*. 2007; 55(9):1333-8.
 38. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil*. 2007; 34(8):606-12.
 39. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, Ito IY. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont*. 2009; 18(5):427-31.
 40. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergano CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: Effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil*. 2003; 30(5):532-6.
 41. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J*. 2012; 23(5): 547-554.
 42. Peracini A, Andrade IM, Paranhos HF, Silva CH, de Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J*. 2010; 21(3):247-52.
 43. Preshaw PM, Walls AWG, Jakubovics NS, Moynihan PJ, Jepson NJA, Loewy Z. Association of removable partial denture use with oral and systemic health. *J Dent*. 2011; 39(11): 711-719.
 44. Powell GL, Runnells RD, Saxon BA, Whisenant BK. The presence and identification of organisms transmitted to dental laboratories. *J Prosthet Dent*. 1990; 64(2):235-7.
 45. Rossato MB, Unfer B, May LG, Braun KO. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. *Oral Health Prev Dent*. 2011; 9(3):221-7.
 46. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Buscioano M, Milillo L, Guida A, Petrucci M, Serpico R. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2): 139-43.

47. Salles MM, Oliveira V de C, de Souza RF, Silva CH, Paranhos H de F. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning - *in vitro* evaluation. Braz Oral Res., 2015 29(1):1-6.
48. Silva-Lovato CH, Wever BD, Adriaens E, Paranhos H de F, Watanabe E, Pisani MX, de Souza RF, Ito IY. Clinical and antimicrobial efficacy of NitrAdine TM based disinfecting cleaning tablets in complete denture wearers. J Appl Oral Sci. 2010 18(6):560-5.
49. Uludamar A, Özkan YK, Kadir T, Ceyhan I. In vivo efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on *Candida albicans* in patients with denture stomatitis. J Appl Oral Sci. 2010; 18(3): 291-296.
50. Vieira AP, Senna PM, Silva WJ, Del Bel Cury AA. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida* spp. biofilm recolonization on liner surface. Braz Oral Res. 2010; 24(3):342-8.
51. Williams DW, Chamary N, Lewis MAO, Milward PJ, Mcandrew R. Microbial contamination of removable prosthodontic appliances from laboratories and impact of clinical storage. Br Dent J. 2011; 211(4): 163-166.
52. Zlataric DK, Celebic A, Valentic-Peruzovic M. The effect of removable partial dentures on periodontal health of abutment and non-abutment teeth. J Periodontol. 2002; 73(2):137-44.