



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Materiais Dentários e Prótese
Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral



CAROLINE VIEIRA FORTES

Avaliação *in vitro* da formação de biofilme, efetividade de protocolos de higienização, e força de adesão em espécimes de resina acrílica contendo adesivo.

Ribeirão Preto – SP

2021

CAROLINE VIEIRA FORTES

Avaliação *in vitro* da formação de biofilme, efetividade de protocolos de higienização, e força de adesão em espécimes de resina acrílica contendo adesivo.

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

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva

VERSÃO ORIGINAL

Ribeirão Preto – SP

2021

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

Fortes, Caroline Vieira

Avaliação in vitro da formação de biofilme, efetividade de protocolos de higienização, e força de adesão em espécimes de resina acrílica contendo adesivo. Ribeirão Preto, 2021.

113p. : il ; 30 cm

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

Versão original

Orientadora: Silva, Cláudia Helena Lovato da

1. Prótese Total. 2. Adesivos. 3. Biofilme; 4. UFC. 5. XTT. 6. Higiene. 7. Remoção. 8. Adesão

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fortes, CV. **Avaliação in vitro da formação de biofilme, efetividade de protocolos de higienização, e força de adesão em espécimes de resina acrílica contendo adesivo.**

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

Aprovado em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a). Dr. (a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a). Dr. (a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a). Dr. (a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatoria

À **Deus**, pelo o dom da vida e pelo o Seu amor que dura para sempre. Por estar comigo em todos os momentos, me protegendo e me guiando pelo o caminho da verdade. Ele me abençoa e a sua misericórdia se renova a cada amanhecer e produz em mim uma imensa gratidão. O seu amor incondicional lapida o meu caráter dia após dia e devo tudo que sou a Ti.

“Bendito seja o Senhor, pois ouviu as minhas orações. O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele o meu coração confia, e dele recebo ajuda. Meu coração transborda de alegria, e com o meu cântico lhe darei graças.”

Salmos 28:6-7

Aos meus pais, **Jânio** (*in memoriam*) e **Suelande**, pelo apoio e incentivo de buscar a realização dos meus sonhos. Obrigada por investirem na minha educação, sem o estímulo de vocês na minha infância não chegaríamos nesse momento. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação. Amo vocês! Obrigada mamis pela compreensão e paciência durante esses anos.

“Ainda que eu falasse a língua dos homens, e falasse a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria”

1 Coríntios 1:13

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora **Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva**, que me deu a oportunidade de trabalhar ao seu lado, e me sinto honrada em ser sua orientada. Sou grata por compartilhar o seu conhecimento e depositar em mim a sua confiança. Obrigada professora, pelas inúmeras ajudas ao longo desses anos, e também pela compreensão e paciência. Te admiro muito por ser exemplo de professora, pesquisadora e ser humano.

Agradecimientos

As minhas irmãs, **Cristina** e **Cristiane**, obrigada por apoiarem as minhas decisões e estarem comigo em todos os momentos. Amo vocês!

A minha sobrinha **Isabela** e ao meu afilhado **Alex Filho**, por serem o raio de sol da minha vida e me ensinar todos os dias que a vida é simples.

Ao meu cunhado **Alex Palmer**, por ser um grande amigo e irmão, obrigada por sempre me incentivar. Admiro você!

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, na pessoa do diretor Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, por permitir a minha formação profissional e aprendizado.

À **Capex (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela concessão das bolsas (processo nº: 88882.378857/2019-01 e 88887.636775/2021-00).

Ao Chefe do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, **Prof. Dr. Ricardo Ribeiro Faria**, obrigada pela dedicação e respeito.

À Coordenadora da Pós-Graduação em Odontologia (Reabilitação Oral) **Profª. Dra. Andréa Cândido Reis**, pelo acolhimento e esforço para tornar o programa sempre melhor e mais respeitado.

À **Profª. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza**, por ser a minha relatora e pela contribuição durante o mestrado.

Aos docentes da disciplina de prótese total, **Profª. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos** e **Prof. Dr. Valdir Antonio Muglia** por todos os ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Evandro Watanabe**, pela contribuição científica e ensinamentos ao longo desses anos.

À **Profa. Dra. Alma Blásida Concepcion Elizaur Benitez Catirse**, pelo incentivo e colaboração ao decorrer da minha formação no mestrado.

Aos demais **Professores** do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelas contribuições na minha formação acadêmica, respeito e dedicação.

Aos Técnicos **Edson Volta** e **Viviane de Cássia Oliveira**, pela contribuição técnica para realizar este trabalho.

Aos secretários **Fernanda Talita de Freitas**, **Regiane de C. Tirado Damasceno** e **Wagner del Gatto**, obrigada pela ajuda e suporte em todas solicitações

À **Adriana Barbosa Ribeiro**, que desde a minha chegada em Ribeirão Preto me acolheu e me ensinou sobre pesquisa e sobre a vida. Gratidão eterna por toda ajuda, motivação, puxão de orelha, dedicação e sobretudo, pela a sua amizade que é fundamental para mim, obrigada por sempre me ouvir e aguentar os meus dramas. Agradeço pela contribuição na elaboração dessa pesquisa.

À **Viviane de Cássia Oliveira**, por todos os momentos que passamos, e em especial, pelos ensinamentos técnico-científicos. Obrigada pelo o acolhimento ao laboratório e à sua família. Sou grata pela sua parceria e sua amizade que fazem total diferença no cotidiano. Além disso, obrigada pela sua disponibilidade e ombro amigo.

À **Aline Barbosa Ribeiro**, e por todas as dicas e colaboração na minha formação científica.

À **Camila Borba de Araújo**, pela amizade, convívio e as inúmeras ajudas.

A **Laís Ranieri Makrakis**, pela ajuda prestada no momento que mais precisei para elaboração da dissertação, e obrigada pela convivência e risos das minhas piadas sem graça.

Ao **Victor Barboza da Mata**, pelo companheirismo e amizade ao longo desses anos, obrigada por todos os momentos de descontração e partilhas de sentimentos. Sou grata à Deus por ter colocado você no meu caminho. É sobre isso!

Ao grupo de pesquisa LabPRO, **Profª. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva**, **Adriana Barbosa Ribeiro**, **Carla Maria de Almeida Prado Magdalena**, **Laís Ranieri Makrakis**, **Lorena Mosconi Clemente**, **Thiago Naves Costa Queiroz**, **Beatriz Tinelli**, **Daira Sousa**, **Priscilla Lai Liu**, **Sheila Prates**, **Vinícius Pontes** e **Viviane de Cássia Oliveira**, pelas reuniões de sexta-feira à tarde, na qual aprendi muito com vocês.

Aos amigos da Pós-Graduação, **Juliana Dias Corpa Tardelli**, **Victor Barboza da Mata**, **Thiago Naves Costa Queiroz**, **Laís Ranieri Makrakis**, **Letícia Ferreira Montarele**, **Hian Parize**, **Daniel Zuluaga Goyeneche**, **Brenda Gonçalves de Carvalho**, **Murilo Rodrigues de Campos**, **Andrezza Cristina dos Santos Moura**, **Allan Oliveira da Silva**, **Yumi Chokyu Del Rey**, obrigada pelo companheirismo e apoio.

Ao **Felipe Lazarini Bim** pela ajuda técnica e convívio.

À **Glenda Lara Lopes Vasconcelos**, obrigada pelo incentivo e ajuda desde a graduação. Obrigada por ser essa amiga que mesmo longe se faz presente e além de tudo, sou grata pela cumplicidade e lealdade.

As minhas Professoras da Graduação **Profª. Dra. Ana Lúcia Ribeiro Roselino**, **Profª. Dra. Tatiana Ramirez Cunha**, e **Profª. Dra. Carla Cecília Alândia Romão**, por

proporcionarem os primeiros passos com a pesquisa. MUITÍSSIMO obrigada pelos ensinamentos que me deram.

Aos meus amigos da Graduação, **Murilo Paiva, Hebert Limeira, Elen Lemes, Samara Aguiar, Thauanny Suyan, Luiza Oliveira, Daiane Landim e Fernanda Motta**, que sempre torceram, incentivaram e comemoraram as minhas vitórias.

À **Dona Eva Ferreira Carvalho**, pelo acolhimento nessa cidade e ter zelo especial por mim. Sou grata pelo carinho, apoio, cuidado e amizade.

À minha **família**, pelo o apoio e incentivo ao longo dos anos.

A todos os **amigos, colegas, colaboradores e funcionários** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP, pela amizade, companheirismo, ensinamentos e disponibilidade.

“Todo ser humano nasce com a eternidade no coração e anseia realizar grandes coisas. Nasce com uma sede por significado e propósito, mas nem sempre o significado é claro, nem sempre as respostas são certas, nem sempre entendemos os porquês. Queremos lutar na frente de batalhas, mas somos convocados a cantar de vitórias que nunca vimos, e de que não participamos. Queremos ser reconhecidos por grandes feitos, mas somos convocados a cuidar de jardins desconhecidos. Queremos ser livres para viver a vida com o que sempre sonhamos, mas somos convocados a proteger um portão que parece ter sido esquecido.”

Thiago Arrais

Resumo

Fortes, CV. **Avaliação in vitro da formação de biofilme, efetividade de protocolos de higienização, e força de adesão em espécimes de resina acrílica contendo adesivo.** [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2021.

RESUMO

Esse estudo avaliou a formação de biofilme, a efetividade de protocolos de higiene e a força de adesão frente aos adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) para prótese total. Biofilme misto de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans* foi formado sobre a superfície de espécimes circulares em resina acrílica termopolimerizável (12 mm X 3 mm) contendo os adesivos A1 e A2. Para formação de biofilme (n=33), após a semeadura em meios de cultura específicos e 48 horas de incubação foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Um grupo em resina foi usado como controle (GCr). Em outros espécimes com biofilme foram aplicados os protocolos de higiene associando escovação manual com sabão neutro e imersão em água (G1) ou imersão em Triclosan a 0,15% (G2) ou imersão em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3), seguido de semeadura, contagem de UFC (n=78) e avaliação do metabolismo celular (XTT, n=60). Um grupo sem higienização serviu como controle. Para força adesiva foi empregado ensaio de tração de dois espécimes cilíndricos (25mmØ x 35mm, n=15) interpostos por pele de porco e adesivo, imediatamente após a aplicação (T0) e após 5 minutos (T5 min) e 4 horas (T4 h). Os dados foram analisados por Testes Anova (One-way)/Tukey, Modelo linear generalizado com ajuste de Bonferroni, Anova (Two-way)/Tukey e Anova com medidas repetidas/Tukey ($\alpha = 5\%$). Houve maior contagem de UFC de *C. albicans* com adesivo A2; GC e A1 foram iguais entre si ($p < 0,000$). Para *C. glabrata* ($p < 0,000$) e *S. mutans* ($p < 0,000$), a carga microbiana com A1 e A2 foi semelhante entre si e maior que o controle. A contagem de UFC de *S. aureus* não foi influenciada pelo adesivo ($p = 0,287$). Os protocolos de higiene reduziram significativamente a carga microbiana se comparado com o controle; houve interação entre os fatores para todos os micro-organismos (*C. albicans*: $p = 0,001$; *C. glabrata*: $p = 0,002$; *S. aureus*: $p = 0,022$ e *S. mutans*: $p = 0,012$). O protocolo G3 eliminou *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*, independente do adesivo. O protocolo G2 associado ao adesivo A2 reduziu a contagem de UFC destes 3 micro-organismos. Contra *S. aureus*, o protocolo G3 associado ao adesivo A2 foi mais efetivo, seguido do protocolo G2. O metabolismo celular foi dependente dos protocolos de higiene ($p = 0,000$). Com protocolo G3, os micro-organismos não apresentaram metabolismo celular e com G2 e G1 houve diminuição significativa do metabolismo celular em relação ao grupo sem higienização. Para força de adesão houve interação entre adesivo e tempo ($p = 0,007$). Em T0 a força foi maior para o adesivo A1 com aumento após a passagem do tempo; porém, em T5 min e T4 h, a força foi maior para o adesivo A2 com aumento entre T0 e T5 min; entre T5 min e T4 h não houve diferença significativa. O uso dos adesivos favoreceu o acúmulo de biofilme e a escovação e imersão em hipoclorito de sódio a 0,25% foi mais efetivo, seguido de escovação e imersão em Triclosan a 0,15%. A força de adesão foi maior e mais estável com o adesivo OlivaFix® Gold.

Palavras-Chave: 1) Prótese Total; 2) Adesivos; 3) Biofilme; 4) UFC; 5) XTT; 6) Higiene; 7) Remoção; 8) Adesão

Abstract

Fortes, CV. **In vitro evaluation of biofilm formation, effectiveness of cleaning protocols, and bond strength on adhesive-containing acrylic resin specimens.** [Dissertation]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2021.

ABSTRACT

This study evaluated biofilm formation, the effectiveness of hygiene protocols and bond strength against Ultra Corega Creme (A1) and OlivaFix® Gold (A2) adhesives for total dentures. Mixed biofilm of *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* and *S. mutans* was formed on the surface of circular heat-cured acrylic resin specimens (12 mm X 3 mm) containing A1 and A2 adhesives. For biofilm formation (n=33), after seeding in specific culture media and 48 hours of incubation, colony forming units (CFU) were counted. A resin group was used as control (CGr). In other specimens with biofilm the hygiene protocols associating manual brushing with neutral soap and immersion in water (G1) or immersion in 0.15% Triclosan (G2) or immersion in 0.25% sodium hypochlorite (G3) were applied, followed by seeding, CFU counting (n=78) and evaluation of cell metabolism (XTT, n=60). A group without sanitization served as control. For adhesive strength, two cylindrical specimens (25 mm Ø x 35 mm, n=15) interposed by pigskin and adhesive were tensile tested immediately after application (T0) and after 5 minutes (T5 min) and 4 hours (T4 h). Data were analyzed by Anova (One-way)/Tukey tests, Generalized linear model with Bonferroni adjustment, Anova (Two-way)/Tukey e Anova with repeated measures/Tukey tests ($\alpha = 5\%$). There were higher CFU counts of *C. albicans* with adhesive A2; GC and A1 were equal to each other (p0.000). For *C. glabrata* (p0.000) and *S. mutans* (p0.000), microbial load with A1 and A2 were similar to each other and higher than the control. The CFU count of *S. aureus* was not influenced by the adhesive (p=0.287). The hygiene protocols significantly reduced the microbial load compared to the control; there was interaction between the factors for all microorganisms (*C. albicans*: p=0.001; *C. glabrata*: p=0.002; *S. aureus*: p=0.022 and *S. mutans*: p=0.012). Protocol G3 eliminated *C. albicans*, *C. glabrata* and *S. mutans*, regardless of the adhesive. The G2 protocol associated with the A2 adhesive reduced the CFU count of these 3 microorganisms. Against *S. aureus*, the G3 protocol associated with the A2 adhesive was more effective, followed by the G2 protocol. Cell metabolism was dependent on hygiene protocols (p=0.000). With protocol G3, the microorganisms showed no cellular metabolism and with G2 and G1 there was a significant decrease in cellular metabolism compared to the group without hygiene. For adhesion strength there was an interaction between adhesive and time (p=0.007). At T0, the bond strength was greater for adhesive A1, with an increase after time; however, at T5 min and T4 h, the strength was greater for adhesive A2, with an increase between T0 and T5 min; between T5 min and T4 h there was no significant difference. The use of adhesives favored biofilm accumulation, and brushing and immersion in 0.25% sodium hypochlorite was more effective, followed by brushing and immersion in 0.15% Triclosan. The bond strength was higher and more stable with the OlivaFix® Gold adhesive.

Key words: 1) Complete Dentures; 2) Adhesives; 3) Biofilm; 4) CFU; 5) XTT; 6) Hygiene; 7) Removal; 8) Adhesion

Lísta de Figuras e Fluxogramas

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

FIGURAS

Figura 1-	(A) Politriz horizontal (B) Acabamento em uma das faces do corpo de prova circular com lixa d'água.....	60
Figura 2-	Corpo de prova circular (12mm x 3mm) após o acabamento.....	60
Figura 3-	Confecção dos corpos de prova cilíndricos. A) Matrizes de cera nº 9 com 25mm de diâmetro x 35mm de comprimento; B) Inclusão dos padrões de cera na mufla metálica com gesso tipo III; C) Retirada dos padrões cilíndricos para acomodação da resina autopolimerizável; D) Prensagem da resina com carga de final de 1.000 kgf por 30 minutos; E) Polimerização em panela de cocção com pressão de ar de 20 libras por 20 minutos; F) Corpos de prova cilíndrico após a polimerização; G) Corpos de prova após a demuflagem.....	61
Figura 4-	A) Politriz horizontal; B) Polimento dos corpos de prova cilíndricos com tira de lixa em politriz horizontal.....	62
Figura 5-	Adesivos empregados no estudo; A) Adesivo Ultra Corega Creme (A1); B) Adesivo OlivaFix® Gold.....	63
Figura 6-	Espécimes circulares contendo adesivo A1 e A2 para formação do biofilme misto.....	64
Figura 7-	A) Espécimes sendo retirados da placa de cultura celular após 48h inoculação; B) Transferência dos espécimes para os tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura LB.....	65
Figura 8-	A) Crescimento de <i>C. albicans</i> ; B) <i>C. glabrata</i> ; C) <i>S. aureus</i> ; D) <i>S. mutans</i> em placa Petri com os respectivos meios de cultura com diferentes diluições (10^0 a 10^{-3}).....	66
Figura 9-	A) Escova Tek recendo 1 gota de sabão neutro para realizar a escovação; B) Escovação do espécime com sabão neutro por 20 segundos.....	68
Figura 10-	Imersão dos corpos de prova em uma das soluções por 20 minutos.....	69
Figura 11-	Placa de 24 poços com os espécimes em posição após os protocolos de higiene para o ensaio de XTT.....	71
Figura 12-	A) Leitor de microplacas; B) Placa de 96 poços contendo 100 µL da solução para leitura.....	71
Figura 13-	Corpo de prova cilíndrico revestido com a pele suína.....	72
Figura 14-	Corpo de prova contendo 0,5 gramas de adesivo.....	73

Figura 15-	Aplicação da força de compressão de 12 N por 30 segundos.....	73
Figura 16-	A) Ensaio de tração a uma velocidade de 1mm por minuto; B) Descolamento do conjunto.....	74
Figura 17.	Comparação das médias (DP) da porcentagem (%) de redução do metabolismo celular do biofilme misto (Cores iguais indicam igualdade estatística).....	84

FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1-	Distribuição dos corpos de prova para realização do ensaio de formação de biofilme.....	62
Fluxograma 2-	Formação dos grupos para análise da ação antimicrobiana.....	67
Fluxograma 3-	Formação dos grupos para análise do metabolismo celular.....	69

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Materiais utilizados no estudo.....	57
Tabela 2-	Contagem de UFC+1 (Log10) de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i> na superfície de corpos de prova em resina acrílica (GC), com adesivos Ultra Corega Creme (A1) ou OlivaFix® Gold (A2).....	77
Tabela 3-	Comparação das médias (DP) da contagem de UFC+1 (Log10) de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i> presentes na superfície de corpos de prova em resina acrílica (GCr), com adesivo Ultra Corega Creme (A1) ou OlivaFix® Gold (A2).....	78
Tabela 4-	Contagem de UFC+1/mL (Log10) de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i> sobre a superfície de corpos de prova com adesivos A1 e A2 dos grupos sem higienização (GCsh), após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).....	79
Tabela 5-	Comparação da contagem de UFC+1/mL (Log ₁₀) de <i>C. albicans</i> com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix Gold® (A2) do grupo controle (sem higienização) e após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).....	80
Tabela 6-	Comparação da contagem de UFC+1/mL (Log10) de <i>C. glabrata</i> com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) do grupo controle (GCsh) e após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).....	80
Tabela 7-	Comparação da contagem de UFC+1/mL (Log10) de <i>S. aureus</i> com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) do grupo controle (sem higienização) e após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).....	81
Tabela 8-	Comparação da contagem de UFC+1/mL (Log ₁₀) de <i>S. mutans</i> com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) do grupo controle (sem higienização) e após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).....	82

Tabela 9-	Metabolismo celular [(Absorbância em nM e porcentagem de redução do metabolismo (%)] do biofilme misto na superfície da resina acrílica (CGr) e em associação aos adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) no grupo sem higienização (GCsh), após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).....	83
Tabela 10-	Valores de força de adesão (N) entre os corpos de prova em resina acrílica com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) imediatamente após a aplicação do adesivo (T0) e após 5 minutos (T5 min) e 4 horas (T4 h).....	84
Tabela 11-	Comparação das médias (DP) da força de adesão (N) entre os corpos de prova com adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2), imediatamente (T0) após a aplicação e após 5 minutos (T5 min) e 4 horas (T4 h).....	85

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	43
2. PROPOSIÇÃO	51
2.1 Objetivo Geral.....	53
2.2 Objetivos específicos.....	53
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Delineamento do Estudo	57
3.2 Confeção dos corpos de prova	58
3.3 Desfecho.....	62
3.3.1 Avaliação da formação de biofilme sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica associada aos adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2).	62
3.4 Avaliação da ação antimicrobiana dos protocolos de higiene sobre o biofilme misto formado sobre os corpos de prova com adesivos	66
3.5 Avaliação do Metabolismo Celular dos micro-organismos em biofilme misto	69
3.6 Avaliação da força de adesão dos adesivos A1 e A2 após aplicação em corpos de prova de resina acrílica.....	71
3.7 Análise dos Dados.....	74
4. RESULTADOS	75
4.1 Formação de biofilme	77
4.2 Ação antimicrobiana dos protocolos de higiene escovação com imersão em Água (G1), Triclosan 0,15% (G2) e Hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).	78
4.3 Metabolismo celular do biofilme misto.....	82
4.4 Força de adesão dos adesivos Ultra Corega Creme e OlivaFix® Gold após aplicação em corpos de prova de resina acrílica.....	84
5. DISCUSSÃO	87
5.1 Formação de Biofilme.....	90
5.2 Ação Antimicrobiana.....	93
5.3 Atividade Metabólica.....	95
5.4 Força adesiva	96
6. CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS	103

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, aproximadamente 11% da população são de pessoas com 60 anos ou mais (MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014), e dentre elas, 3 em cada 4 são desdentadas em pelo menos uma arcada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004); estima-se que 38,3% dessa população necessita de próteses totais em um ou dois arcos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Baseado nos censos epidemiológicos realizados no Brasil em 1986, 2003 e 2010, Cardoso et al., (2016) estimaram que em 2040, 85,96% da população idosa terá as arcadas desdentadas, representando 64 milhões de indivíduos desdentados.

As próteses totais convencionais são opções de tratamento para a reabilitação da maioria dos indivíduos desdentados e, embora as próteses maxilares, normalmente, forneçam efetiva solução para a reposição dos dentes superiores, às próteses totais mandibulares podem ser desconfortáveis para grande parte dessa população. Essas próteses dependem fundamentalmente do rebordo alveolar residual e mucosa suprajacente para suporte, retenção e estabilidade. No entanto, como consequência à perda dentária, o rebordo residual sofre reabsorção contínua o que compromete a retenção das bases protéticas e a qualidade de vida do paciente (CARLSSON, 1998, REGIS et al., 2013).

Em indivíduos desdentados a força da mastigação de usuários de próteses totais é, em média, 1/4 a 1/7 daquela observada em dentados (FONTIJN-TEKAMP et al., 2000) e, portanto, bem aquém do que seria ideal. O uso de próteses instáveis compromete ainda mais a função mastigatória, levando à uma deficiente nutrição e ingestão de alimentos pobre em nutrientes, de aspecto macio, em detrimento daqueles mais nutritivos como frutas, legumes e carnes (ALLEN, 2005; MULLER, 2005).

A utilização de implantes dentários é uma alternativa reconhecida na literatura para a reabilitação oral (MUNDT et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015) e uma excelente opção de tratamento para indivíduos desdentados, uma vez que, contribui para a adequada retenção de próteses (FEINE et al., 2002; RIBEIRO et al., 2015). Entretanto, devido fatores psicológicos ou por receio ao procedimento cirúrgico, não são todos os pacientes que se expõem aos procedimentos cirúrgicos de instalação para implantes (ASSUNÇÃO et al., 2007; de SOUZA et al., 2015).

Em muitas situações, o tempo de recuperação e o alto custo limitam o acesso dos pacientes ao tratamento (MUNDT et al., 2009). Em casos de cirurgias que são invasivas e despedem de maior durabilidade, podem colocar em risco pacientes geriátricos com comorbidades, como, por exemplo, cirurgias que necessitam de enxertos ósseos. (MUNDT et al., 2015). Assim, naquelas situações em que as próteses totais são a única alternativa de tratamento, seria ideal que os fatores custo/efetividade/disposição dos pacientes fossem considerados para tomada de decisão clínica por meio de dentistas e usuários.

A literatura aponta que o uso de adesivos associados às bases das próteses totais melhora a retenção desses dispositivos, aumentando as propriedades adesivas e coesivas, bem como a viscosidade do meio entre as próteses removíveis e tecidos de suporte, eliminando espaços vazios entre eles (MARIN et al., 2014; TORRES-SÁNCHEZ et al., 2018). Como consequência, promovem maior estabilidade e menor acúmulo de partículas alimentares entre a prótese e a mucosa em comparação ao não uso de adesivos para próteses totais (TORRES-SÁNCHEZ et al., 2018; MOUNIR ATASSI et al., 2019).

Porém, para pacientes que apresentam xerostomia, os adesivos apresentam limitações (POLYZOIS et al., 2013). O mecanismo de ação do adesivo baseia-se na combinação de forças físicas e químicas. As forças físicas dependem da exposição do adesivo à saliva para proporcionar aumento de volume, principalmente por causa da natureza hidrofílica de alguns dos seus componentes e da viscosidade da saliva, promovendo aumento da força de adesão entre a prótese e a mucosa. As forças químicas dependem das reações geradas entre ingredientes que oferecem bioadesão (GRASSO, 1996). Portanto, é esperado que a escassez de saliva afete as propriedades adesivas do material, com impacto negativo no desempenho do adesivo (TURNER et al., 2008; CLOSE et al., 2011; SHIMAZU et al., 2014).

Os adesivos podem ser classificados em insolúveis ou solúveis. Os insolúveis são representados pelas fitas adesivas impregnadas com um componente ativo a base de água como alginato de sódio ou polímero de óxido de etileno e são ativados pela presença da saliva. Os adesivos solúveis são aqueles em forma de pós, pasta ou creme e seus ingredientes ativos são sais de polímeros com diferentes graus de solubilidade em água como Carboximetilcelulose (CMC), de curta ação, e Poli vinil-éter metil celulose (PVM-MA), de longa ação. Ainda, são incorporados sais de cálcio e zinco para melhorar a adesão; os cremes e pastas podem apresentar ainda

componentes não ativos como derivados do petróleo, óleo mineral e óxido de polietileno que facilitam a colocação; aromatizantes; tintura para cor; e conservantes (GRASSO, 2004). A literatura sugere que o zinco presente em diversos adesivos, quando utilizados por períodos prolongados, pode causar a elevação dos níveis séricos de zinco, resultando em redução do cobre sérico e depressão da medula óssea juntamente com neuropatias sensoriais e motoras generalizadas em pacientes adultos (HEDERA et al., 2008). Os polímeros derivados de petroquímicos, como a vaselina usada na maioria dos adesivos para próteses dentárias removíveis, podem contribuir para o desenvolvimento de candidíase oral e estomatite (ARENDORF, WALKER, 1987).

Em contraponto, relatórios sobre a qualidade de vida relacionada à saúde bucal em usuários de próteses totais afirmaram que esses adesivos aumentam o conforto, a confiança e a satisfação de pacientes com suas próteses (MARIN et al., 2014; TORRES-SÁNCHEZ et al., 2018). Entretanto, conforme relatado por Grasso (1996) muitos dentistas relutam em prescrever estes produtos por medo da associação entre a indicação do uso e o insucesso na confecção das próteses.

Um aspecto importante em relação aos adesivos é sua relação com o biofilme. Estudos têm apontado que o uso de adesivos favorece a deposição de biofilme na superfície interna da prótese com consequente desenvolvimento de estomatite protética (de OLIVEIRA JUNIOR et al., 2018), uma vez que sua remoção completa é difícil de ser realizada pelo paciente, podendo servir de reservatório para micro-organismos, especialmente *C. albicans*. Por isso, métodos efetivos de higiene, associando escovação e agentes antimicrobianos devem ser indicados para a total remoção do adesivo. A literatura tem indicado que a escovação da prótese associada à sua imersão em hipoclorito de sódio a 0,25% ou em Triclosan a 0,15% proporciona bons resultados em relação à remoção do biofilme, remissão da estomatite relacionada à prótese, inibição do crescimento de *C. albicans* e outras espécies de micro-organismos (BADARÓ et al., 2020; ARAÚJO et al., 2021; BADARÓ et al., 2021) por apresentar ação direta na membrana celular (ESTRELA et al., 2002).

Costa et al. (2021) avaliaram, entre outros objetivos, o efeito de diferentes formas de adesivos para próteses dentárias na formação de biofilme, e encontraram que a presença dos adesivos, independentemente do tipo (pó, fita ou creme), promoveu maior formação de biofilme de *Candida albicans*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, Leite et al. (2014) verificaram que o uso de adesivo não modificou a contagem de colônias de micro-organismos da mucosa palatina e dentaduras maxilares de usuários de próteses totais durante o período de 15 dias.

Ainda, como forma de colaborar com o conforto do paciente por meio da indicação de adesivo sem causar problemas para a saúde dos tecidos, a incorporação de agentes antimicrobianos ao material tem sido proposta. Cartagena et al. (2017) propuseram a incorporação de micropartículas de nitrato de miconazol em adesivo experimental para dentadura como forma de prevenir o crescimento de *Candida albicans* e encontraram resultados promissores para a formulação na concentração de 2% do agente antimicrobiano. Almeida et al. (2018) analisaram a efetividade antimicrobiana de um adesivo incorporado com *Equisetum giganteum* e *Punica granatum* a frente a biofilmes de *Candida albicans* em superfícies de resina acrílica e observaram um papel colaborativo e inovador no controle do biofilme. Os autores consideram que a combinação antimicrobiano/adesivo pode ser uma alternativa para uso temporário no tratamento e / ou prevenção da estomatite relacionada à prótese, inflamação que pode ser decorrente da desadaptação dos aparelhos protéticos, hábitos inadequados ou higiene deficiente (SAINTRAIN, de SOUZA,2012).

Atualmente, encontra-se no mercado internacional um adesivo à base de óleo de Oliva (OlivaFix® Gold, bonyf AG, Vaduz, Liechtenstein). Segundo o fabricante, é um produto 100% biológico, sem componentes petroquímicos e zinco, como o recomendado pelo FDA (Food and Drug Administration recommendations). Além disso, a sua fixação pode ter duração total de até 24 horas e devido a presença de grande quantidade de óleo de oliva proporciona propriedades biológicas, bactericida e fungicida (PIETROCOLA et al., 2018; NARDI et al., 2020; MONZILO et al., 2020; ZAKRZEWSKI et al., 2020). Pelo nosso conhecimento, poucos estudos foram realizados para avaliar este adesivo. Darwish e Narssani (2016) avaliaram o efeito de 4 adesivos, sendo eles o OlivaFix® Gold, Corega Super Cream, Corega Ultra Powder, Protefix Cream, sobre a rugosidade de superfície de dois materiais para prótese total. Os resultados indicaram que a maioria dos adesivos investigados parece não afetar a rugosidade da superfície e que apenas Corega super cream produziu aumento detectável na rugosidade de superfícies polidas de espécimes de base de dentadura. Mascolo et al. (2019) avaliaram o adesivo OlivaFix® Gold, por

meio de um ensaio clínico, com 107 usuários de próteses em 3 países que apresentam diferentes características socioeconômicas dos usuários (França, Itália e Romênia). Os resultados indicaram melhora em termos de estabilidade da prótese, retenção, tempo de retenção, sensação de queimação e sabor, e melhora da qualidade geral de vida. Entretanto, o estudo foi conduzido somente com o adesivo proposto, considerando o paciente controle dele mesmo, sem a adição de um adesivo controle. Azevedo et al. (2021) avaliaram, por meio de um estudo clínico, o efeito do adesivo OlivaFix® Gold no controle do biofilme de *C. albicans*, quando comparado a um adesivo controle e vaselina, como placebo. Os resultados indicaram que o adesivo teste foi mais efetivo que o controle e placebo contra o crescimento de *C. albicans*.

Estudos têm avaliado o Corega (MARIN et al., 2014; TORRES-SÁNCHEZ et al., 2018; SOARES et al., 2018; CASTRO et al., 2021) principalmente a forma Super Cream e o Corega Ultra Power em suas diversas apresentações quanto às propriedades e citotoxicidade; os resultados indicaram que quando aplicado na forma de creme (Super Cream) houve aumento detectável na rugosidade superficial da resina acrílica (DARWISH et al., 2016) e que não houve nenhuma citotoxicidade independentemente da idade do paciente (SOARES et al., 2018).

Em que pese o apresentado, verifica-se que estudos *in vitro* e estudos clínicos ainda são necessários para confirmar a eficácia de novos adesivos quanto à formação de biofilme sobre a superfície da resina acrílica, sua suscetibilidade à protocolos de higiene, bem como a força de adesão dos adesivos à resina acrílica com o intuito de manter a saúde dos tecidos e o conforto do paciente por períodos prolongados. A obtenção de resultados confiáveis pode auxiliar na escolha de adesivos que apresentam boa relação custo/benefício ao paciente, bem como auxiliar o profissional a tomar melhores decisões clínicas sobre novos produtos e suas características.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meio de um estudo *in vitro*, a influência de um adesivo 100% natural para fixação de prótese total sobre a carga microbiana de biofilme formado sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica, avaliar a efetividade de três protocolos de higiene sobre a capacidade de redução da carga microbiana e avaliar a força de adesão dos adesivos à resina acrílica, tendo como comparação um adesivo nacional comumente empregado na literatura.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a formação de biofilme sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica na presença do adesivo Ultra Corega Creme (A1) e do adesivo OlivaFix® Gold(A2);
2. Avaliar a ação antimicrobiana de protocolos de higiene associando escovação com imersão em hipoclorito de sódio a 0,25%, Triclosan 0,15% e água (controle) sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica na presença de A1 e A2;
3. Avaliar o metabolismo celular (atividade respiratória) do biofilme formado sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica na presença do adesivo Corega creme (A1) e do adesivo OlivaFix® Gold (A2);
4. Avaliar a força de adesão dos adesivos A1 e A2 após aplicação em corpos de prova de resina acrílica em diferentes tempos (T0; T5 min; T4 h).

A hipótese nula é que não haveria diferença entre os adesivos e o grupo controle na formação do biofilme misto; não haveria diferença de efeito entre os protocolos de higiene sobre a carga microbiana do biofilme misto formado sobre os adesivos e que não haveria diferença na força adesiva entre os adesivos.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do Estudo

Os materiais utilizados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Materiais utilizados no estudo.

Materiais	Composição	Fabricante
Ultra Adesivo Corega [®]	Sal parcial misto de sódio/cálcio de poli (metilviniléter/ácido maleico), carboximetilcelulose, óleo mineral, vaselina.	GlaxoSmithKline – Argentina S.A
OlivaFix [®] Gold	Goma de celulose, óleo de <i>Olea europaea</i> (oliveira), Cálcio/Sódio, copolímero PVM/MA, óleo de soja hidrogenado, triidroxistearina, sílica, mentol, lecitina, Citruslimonum, mentil lactato.	Bonyf AG- (Liechtenstein. EU) - Suíça
Triclosan 0,15%	10L de solução de hidróxido de sódio* 0,56 M + 0,15 g Triclosan** =0,15% (1,5mg/mL) *Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA **Mix das essências, Belo Horizonte, MG, Brasil.	Solução preparada no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Hipoclorito de Sódio a 0.25%	Cloro ativo (Super Candida [®] Indústria Anhembí, Osasco, São Paulo, Brasil)	Solução titulada no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Sabão neutro	Lauril sulfato de sódio, dietanolamina, cocamidopropil, betaine, metilparabeno, poliquatêmiun 7, ácido cítrico, polietileno glicol, base perolizada, perfume e água	Pleasant, Perol Comercial e Industrial Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil
Escova Tek	Escova macia com 26 tufo de cerdas de nylon (0,25 mm de diâmetro e 10 mm de altura	Johnson & Johnson do Brasil Ind. e Com. Prod. para Saúde Ltda., S. J. dos Campos, SP, Brasil
Resina acrílica termopolimerizável	Resina (Pó): Polimetilmetacrilato; Peróxido de Benzoíla; Pigmentos Biocompatíveis. Monômero: Monômero de Metilmetacrilato; Inibidor	Clássico, Artigos Odontológicos, Clássico Ltda Campo Limpo Paulista – SP, Brasil
Resina acrílica autopolimerizável	Resina (Pó): Polimetilmetacrilato; Peróxido de Benzoíla; Pigmentos; Biocompatíveis. Monômero: Monômero de Metilmetacrilato; Inibidor; DMT	Clássico, Artigos Odontológicos, Clássico Ltda Campo Limpo Paulista – SP, Brasil
Saliva artificial	4g de Carboximetilcelulose, 60g Sorbitol, 1g de Cloreto de Potássio, 1g Cloreto de Sódio, 50mg de Cloreto de Magnésio, 400mg Fosfato de potássio, 2mg de Nipagin (4- Hidroxibenzoato de Metila) e 1 litro de Água Destilada.	Preparada no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Trata-se de um estudo *in vitro* tendo como variáveis de resposta quantitativa e fatores de variação:

(1) formação de biofilme misto, avaliada pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), composto por *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans*, formado sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável sem e com adesivo Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2). Como controle foi empregado um grupo em resina acrílica, sem adição de adesivo (GCr). (2) ação antimicrobiana, avaliada pela contagem de UFC, de protocolos de higiene associando escovação e imersão em água (G1), escovação e imersão em Triclosan 0,15% (G2) e escovação e imersão em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3), sobre o biofilme misto formado sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica com adesivo Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2). Um grupo sem higienização foi adicionado a esta análise (GCsh); (3) metabolismo celular do biofilme misto composto por *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans*, avaliado pelo ensaio de XTT, formado sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica com adesivo Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2), após exposição à escovação e imersão em água (G1), escovação com imersão em Triclosan 0,15% (G2) e escovação com imersão em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3). Um grupo em resina sem higienização (GCsh) e um grupo sem adesivo (GCr) e foram empregados como controle. Os resultados foram interpretados como a porcentagem de redução do metabolismo encontrada nos grupos GCsh, G1, G2 e G3, considerando o metabolismo celular no grupo de resina sem adesivo (GCr) como 100%. (4) força de adesão dos adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) imediatamente (T0) após a aplicação em corpos de prova de resina acrílica interpostos por pele de suíno e após 5 minutos (T5 min) e 4 horas (T4 h) de aplicação.

3.2 Confeção dos corpos de prova

Para análise da formação do biofilme, ação antimicrobiana e metabolismo celular, corpos de prova circulares com 12 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram utilizados. Para confecção dos corpos de prova, moldes foram obtidos a partir de matrizes metálicas (Seção de Oficinas de Precisão, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil) incluídas em muflas metálicas convencionais (OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) com gesso pedra tipo III (Gesso Rio, Orlando Antônio Bussioli ME, Rio Claro, SP, Brasil). Após a presa do gesso, as muflas foram separadas e as matrizes metálicas removidas dos moldes de gesso. A resina termopolimerizável foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante e

pressionada nos moldes por meio do uso de uma espátula número 24 (Duflex, SSWhite, Rio de Janeiro, Brasil) e com uma prensa de bancada (Prensa Hidráulica Protecni, ProtecniEquip. Med., Araraquara, SP, Brasil) foi realizada a prensagem das resinas com carga inicial de 500 kgf e final de 1.000 kgf, a qual foi mantida por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a polimerização de acordo com as recomendações do fabricante em uma polimerizadora eletrônica (Termocycler T100, Ribeirão Preto, SP, Brasil) seguindo o ciclo de polimerização de 30 minutos para o aquecimento da água até 65°C, manutenção desta temperatura por 1 hora; 30 minutos para elevar a temperatura de 65° para 100°C e manutenção à 100°C por 1 hora. Em seguida, as muflas foram mantidas em temperatura ambiente por 12 horas para o seu resfriamento e demuflagem dos corpos de prova, os quais ficaram imersos em água destilada a 50°C por 24 horas em estufa (Odontobrás Ind. e Com. Equip. Med. Odont. Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) para eliminação do monômero residual (BARBOSA et al., 2007).

Os excessos de resina dos corpos de prova foram removidos com fresas (Maxi-Cut; Malleifer SA, Ballaigues, Suíça). Para simular o que acontece na clínica, uma superfície foi polida de forma a obter rugosidade superficial de no máximo 0,2 µm, representando a superfície polida; para simular a superfície interna da prótese qualquer irregularidade visível foi removida com a fresa Maxi-Cut. Na superfície polida, o polimento foi obtido em politriz horizontal (DPU-10, Panambra Industrial e Técnica AS, São Paulo, SP, Brasil) com lixas d'água (Norton Saint Gobain Acessórios Ltda., Guarulhos, SP, Brasil). As dimensões dos corpos de prova foram confirmadas com um paquímetro (CD-6" CSX-B – Mitutoyo Sul Americana Ltda., Suzano, SP, Brasil) (Figura 1). a outra face do corpo de prova teve a rugosidade padronizada com Ra variando de 2,7 a 3,7 µm (ZISSIS et al., 2000). A rugosidade superficial foi mensurada por meio do rugosímetro Surface RoughnessTester SJ-201P (MitutoyoCorp, Kawasaki, Japão) com um *cut off* de 0,8 mm e curso da agulha de 4,8 mm.

Figura 1 – (A) Politriz horizontal **(B)** Acabamento em uma das faces do corpo de prova circular com lixa d'água.

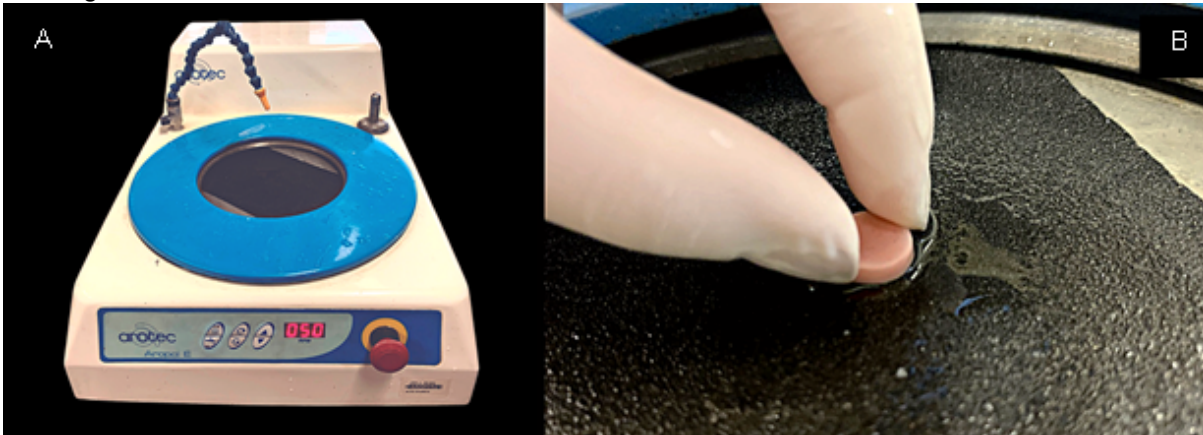


Figura 2 – Corpo de prova circular (12mm x 3mm) após o acabamento.



Para força de adesão, lâminas de cera nº 9 (Polidental, Indústria e Comércio Ltda., Cotia, SP, Brasil) foram utilizadas para preparação de matrizes de cera cilíndricas com 25mm de diâmetro x 35mm de comprimento (CARTAGENA et al., 2017). Em seguida, as matrizes foram incluídas em muflas metálicas convencionais (OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) com gesso tipo III (Gesso Rio, Orlando Antônio Bussioli ME, Rio Claro, SP, Brasil). Após a presa do gesso, as muflas foram separadas e as matrizes de cera foram removidas dos moldes. Em seguida, a resina acrílica auto polimerizável foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante, e em fase plástica foi depositada nos moldes nas muflas com auxílio de uma espátula número 24 (Duflex, SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A prensagem foi realizada em uma prensa de bancada (Prensa hidráulica Protecni. ProtecniEquip. Med., Araraquara, SP, Brasil) com carga inicial de 500 kgf e final de 1.000 kgf a qual foi mantida por 30 minutos. Então, as muflas

foram transferidas para uma prensa de cocção (ProtecniEquip. Med., Araraquara, SP, Brasil) e levadas para polimerização em panela eliminadora de bolhas (VH Essence Dental, Araraquara, SP, Brasil) com pressão de ar de 20 libras por 20 minutos (Figura 3). Foi realizado o acabamento com fresas (Maxi-Cut; Malleifer SA, Ballaigues, Switzerland) afim de remover os excessos de resina dos corpos de prova, e o polimento foi obtido em politriz horizontal (DPU-10, Panambra Industrial e Técnica AS, São Paulo, SP, Brasil) com lixas d'água (nº 80 e 150, Norton Saint Gobain Acessórios Ltda., Guarulhos, SP, Brasil). Uma superfície foi polida para obter rugosidade superficial para simular a superfície interna da prótese (Figura 4). As dimensões dos corpos de prova foram confirmadas com um paquímetro (CD-6" CSX-B – Mitutoyo Sul Americana Ltda., Suzano, SP, Brasil). Os corpos de prova foram armazenados em água destilada a 50°C por 24 horas em estufa (Odontobrás Ind. e Com. Equip. Med. Odont. Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) para eliminação do monômero residual (BARBOSA et al., 2007).

Os corpos de prova foram distribuídos nos grupos experimentais de forma aleatória.

Figura 3 – Confeção dos corpos de prova cilíndricos. **A)** Matrizes de cera nº 9 com 25mm de diâmetro x 35mm de comprimento; **B)** Inclusão dos padrões de cera na mufla metálica com gesso tipo III; **C)** Retirada dos padrões cilíndricos para acomodação da resina autopolimerizável; **D)** Prensagem da resina com carga de final de 1.000 kgf por 30 minutos; **E)** Polimerização em panela de cocção com pressão de ar de 20 libras por 20 minutos; **F)** Corpos de prova cilíndrico após a polimerização; **G)** Corpos de prova após a demuflagem.

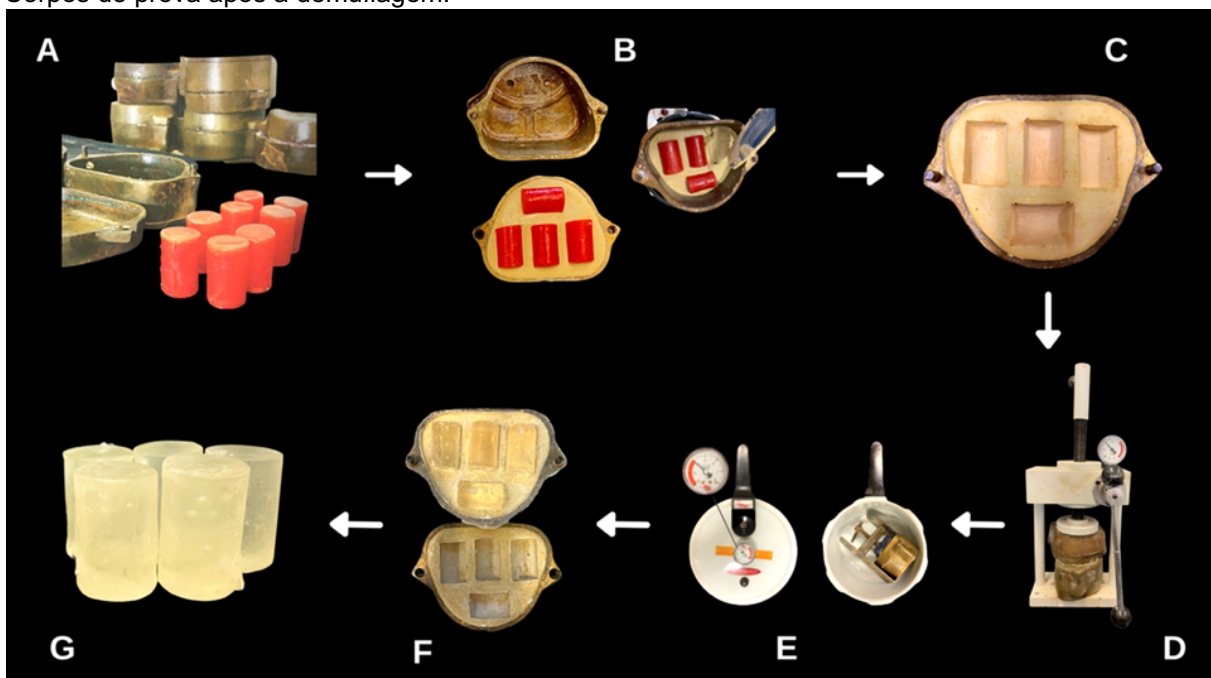
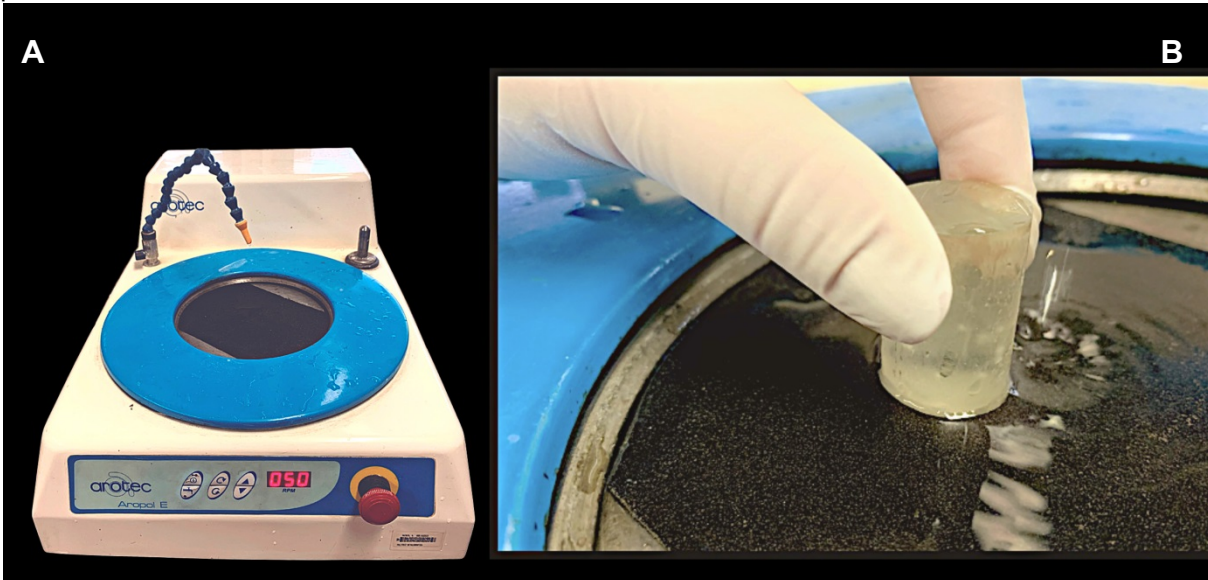


Figura 4 – A) Politriz horizontal; B) Polimento dos corpos de prova cilíndricos com tira de lixa em politriz horizontal.

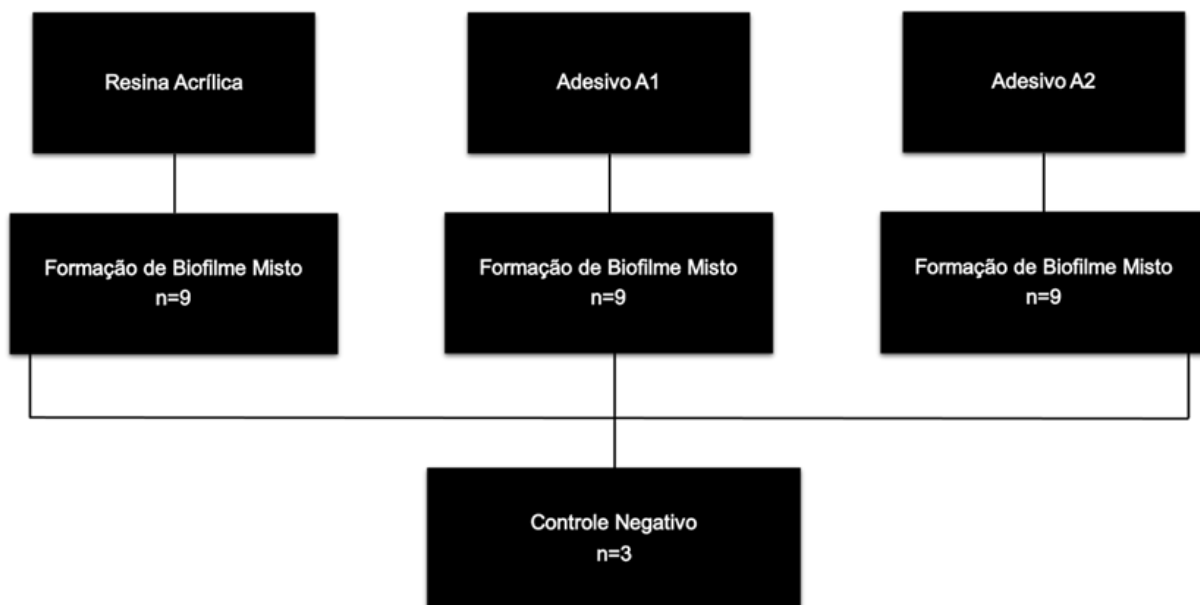


3.3 Desfecho

3.3.1 Avaliação da formação de biofilme sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica associada aos adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2).

Para este ensaio os corpos de prova foram distribuídos de acordo com o fluxograma 1. O ensaio foi realizado em triplicata em três ocasiões diferentes.

Fluxograma 1 – Distribuição dos corpos de prova para realização do ensaio de formação de biofilme.

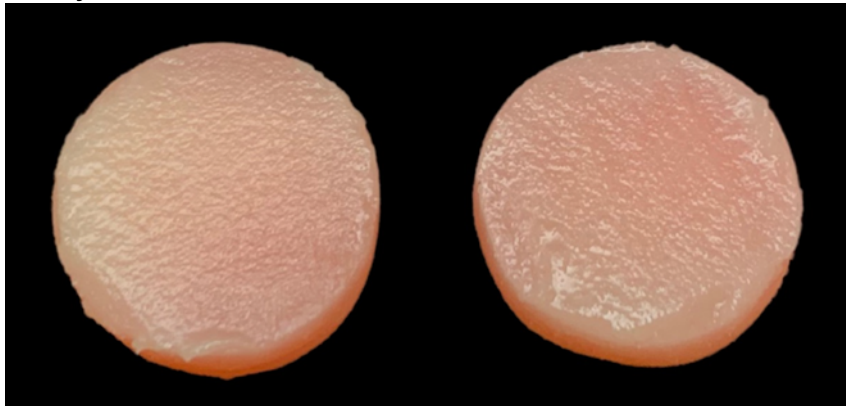


Para eliminar possíveis micro-organismos contaminantes, os corpos de prova foram colocados em béquer com 200 mL de água destilada para esterilização por meio de irradiação em forno de micro-ondas (Panasonic, modelo Perfect, 127V; 800W; 2450MHz), a 650W, durante 6 minutos de exposição (SILVA et al., 2006). O conjunto foi mantido dentro do micro-ondas até o resfriamento e em seguida, transferido para a câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Assepticamente, os corpos de prova foram retirados da água, levemente secos com gaze esterilizada e distribuídos em placas de 24 poços (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), de acordo com o grupo do adesivo (A1 ou A2) (Figura 5) e grupo resina (GCr). Uma porção de 0,080 gramas dos adesivos foi aplicada e espalhada com uma espátula esterilizada, homogeneamente diretamente na superfície das amostras, formando uma fina camada (Figura 6). Após a aplicação, todas as amostras foram submetidas à exposição à luz ultravioleta por 20 minutos para desinfecção dos adesivos. Após 5 minutos, os poços receberam o meio de cultura inoculado com os micro-organismos. Foram utilizadas cepas padrão ATCC, sendo *C. albicans* (ATCC 9028), *C. glabrata* (ATCC 2001), *S. aureus* (ATCC 6538) e *S. mutans* (ATCC 250175).

Figura 5 – Adesivos empregados no estudo; **A)** Adesivo Ultra Corega Creme (A1); **B)** Adesivo OlivaFix® Gold.



Figura 6 – Espécimes circulares contendo adesivo A1 e A2 para formação do biofilme misto.

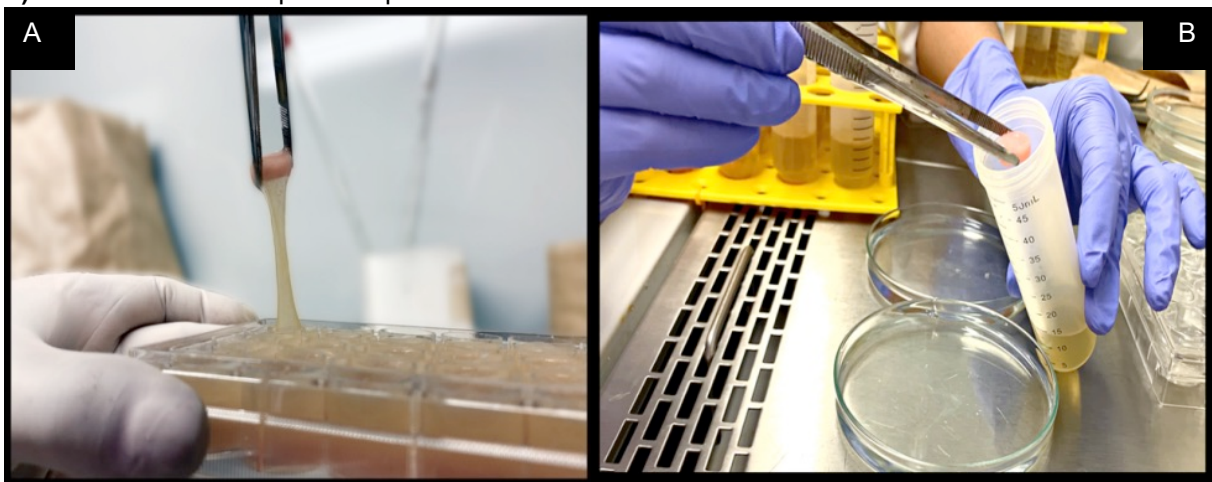


Para o preparo dos inóculos, os micro-organismos foram cultivados descongelados e semeados em forma de estrias em placas de Petri contendo meios específicos, sendo Ágar Sabouraud Dextrose (SDB) (Kasvi, Itália) para *C. albicans* e *C. glabrata*, Brain Heart Infusion Broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Índia) para *S. mutans* e Mueller Hinton Broth (Kasvi, Itália) para *S. aureus*. O tempo de incubação foi de 48h em estufa microbiológica e as placas com *S. mutans* foram incubadas em microaerofilia. Decorrido o tempo de incubação, colônias individuais foram transferidas para os respectivos caldos de cultura, e incubados a 37°C por 48 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas em 4200 g por 5 minutos e lavadas em Solução Salina (PBS). A padronização dos inóculos foi realizada em solução Tampão Fosfato Salina (PBS). A turvação da suspensão bacteriana foi verificada em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia) com leitura da absorbância 625 nm, sendo de 0,075 a 0,080 para *S. aureus* e de 0,110 a 0,115 para *S. mutans*, obtendo 10⁸ Unidades Formadora de Colônia por mililitros (UFC/mL). Para as leveduras, a concentração celular foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer.

Para a formação do biofilme, foram empregadas placas de 48 poços e cada poço recebeu 1,5 mL de caldo de cultura BHI inoculado nas concentrações de 10⁵ para leveduras e 10⁶ para bactéria, com exceção do grupo controle negativo, o qual recebeu meio de cultura estéril para comprovação do ensaio. As placas foram incubadas a 37° C por 48 horas sob agitação de 75 rpm (Incubadora Shaker, CE-320 Cienlab – Equipamentos Científicos, Campinas, SP, Brasil) em microaerofilia para formação de biofilme na superfície dos espécimes. Após esse período, os corpos de prova foram removidos com auxílio de uma pinça estéril, enxaguados 3 vezes em

PBS, para remoção das células não aderidas e inseridos, individualmente, em tubos de polipropileno de 50 mL (Techno PlasticProducts- TPP, Trasadingen, Cantão Schaffhausen, Suíça), devidamente identificados, contendo 10 mL de meio Letheen Broth (LB) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, MH, Índia). Para os corpos de prova sem contaminação, os espécimes foram retirados da placa de cultura celular e transferidos para os tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura LB (Figura 7).

Figura 7 – A) Espécimes sendo retirados da placa de cultura celular após 48h inoculação; **B)** Transferência dos espécimes para os tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura LB.



O conjunto tubo de ensaio/espécime foi levado a uma cuba de ultrassom (40KHz, 200W Altsonic, Clean 9CA, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20 minutos, agitado individualmente em agitador de tubos de ensaio (Phoenix, AP 56, Araraquara, São Paulo, Brasil) e 25 μ L da suspensão foi semeada, com diluições seriadas de 10^0 a 10^{-3} , em meios de cultura específicos para o crescimento dos micro-organismos e posterior contagem das UFC dos micro-organismos, isoladamente (Figura 8). Sendo assim, foram empregados CHROMagar (Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan, EUA) para *C. albicans* e *C. glabrata*; Ágar Manitol Salgado (Kasvi, Itália) suplementado com 200 UI/mL de Nistatina para *S. aureus*; Ágar *Mitis Salivarius*, (Kasvi Itália) suplementado com 200 UI/mL de Nistatina, 0,004 mg/mL de bacitracina e 20% de Sacarose para *S. mutans*. As placas de Petri foram incubadas a 37° C por 48 horas em estufa microbiológica. Para *S. mutans*, a incubação foi realizada em microaerofilia. As suspensões dos corpos de prova referentes ao controle negativo foram semeadas em todos os meios de cultura anteriormente citados.

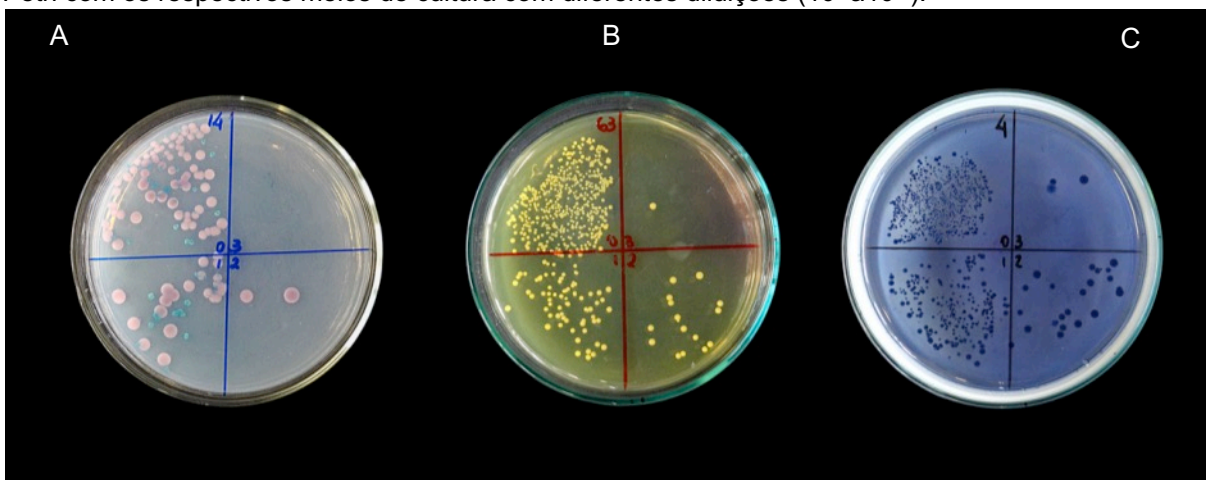
A contagem de UFC foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica (Mod. SQZ-DS4, Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil), para confirmar a morfologia das colônias e o cálculo das UFC/espécime foi realizado considerando a diluição em que se obteve o maior número de contagem entre 1 a 300 colônias e aplicando a seguinte fórmula:

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

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

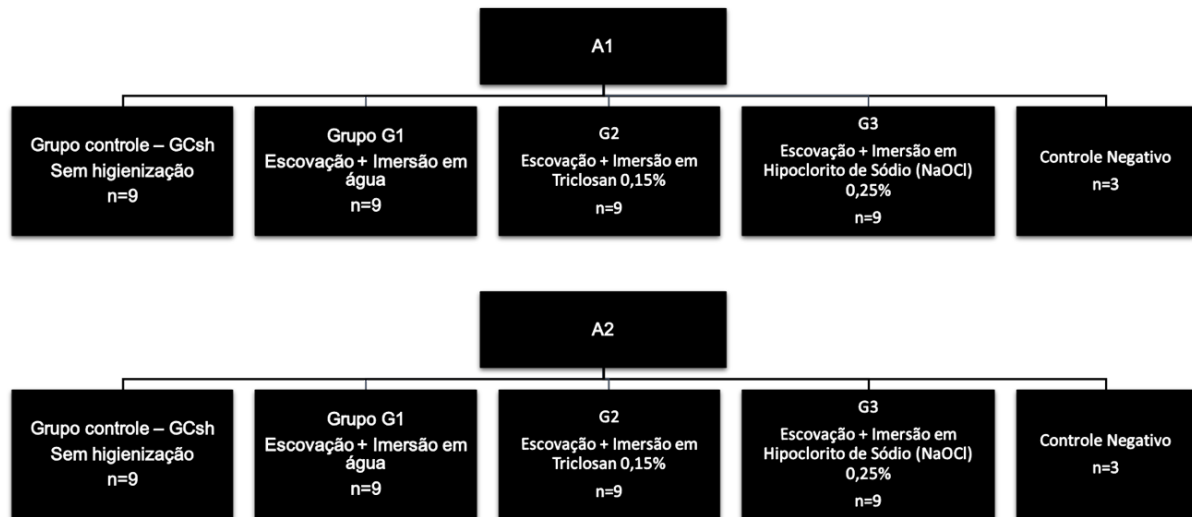
Os tubos de ensaio contendo os corpos de prova foram incubados a 37°C por 28 dias em estufa microbiológica para acompanhamento da presença ou ausência de turvação do meio de cultura e comparação com o crescimento de micro-organismos nas placas semeadas.

Figura 8 – A) Crescimento de *C. albicans*; **B)** *C. glabrata*; **C)** *S. aureus*; **D)** *S. mutans* em placa Petri com os respectivos meios de cultura com diferentes diluições (10^0 a 10^{-3}).



3.4 Avaliação da ação antimicrobiana dos protocolos de higiene sobre o biofilme misto formado sobre os corpos de prova com adesivos

Para este ensaio, os grupos foram formados de acordo com o fluxograma 2. O ensaio foi realizado em triplicata em três ocasiões diferentes.

Fluxograma 2 – Formação dos grupos para análise da ação antimicrobiana.

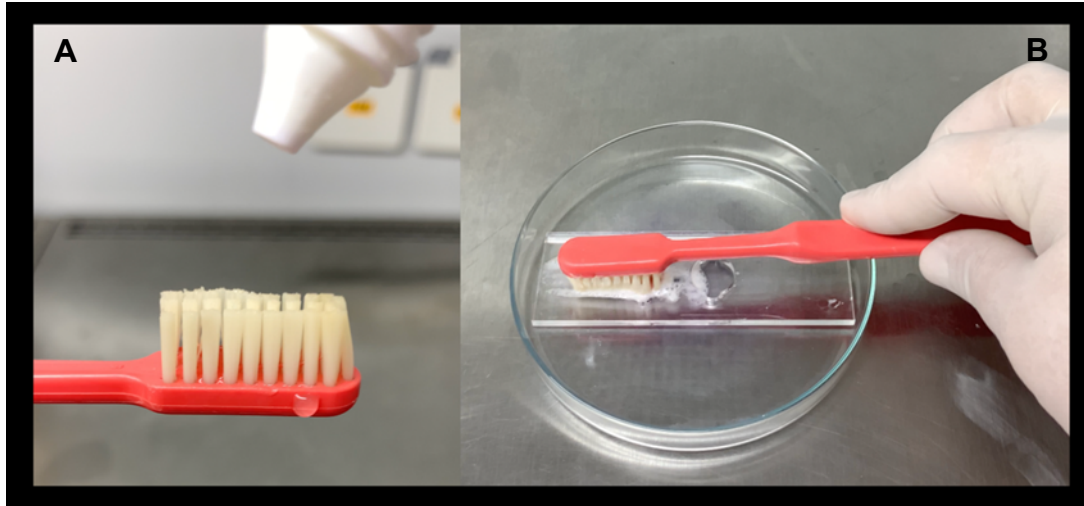
Para esta análise, a preparação dos inóculos e formação de biofilme foi realizada como descrito no item 3.1. Os espécimes contaminados foram distribuídos aleatoriamente nos grupos:

Grupo GCsh – sem higienização (controle)

G1 – Escovação associado a imersão em água: foi realizada em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, SP, Brasil). Com auxílio de pinça estéril, cada espécime foi retirado da placa de cultura celular e posicionado dentro de um orifício preparado com as mesmas dimensões do corpo de prova em placas de Plexiglass (DayBrasil, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para auxiliar o processo de escovação. A superfície contendo o biofilme e adesivo foi colocada de forma a ficar exposta para escovação. As placas de Plexiglass foram previamente desinfetadas por imersão em hipoclorito de sódio a 0,5%, por 20 minutos, seguida de lavagem abundante em água esterilizada e seca com gaze esterilizada (ANVISA, 2000).

A escovação manual foi realizada por um pesquisador previamente calibrado para o procedimento, a fim de eliminar viés. A escovação foi realizada por 20 segundos na superfície plana contendo biofilme e adesivo, com escova dental de cerdas macias Tek (LEITE et al., 2014). Como agente de escovação foi utilizado 01 gota de sabão neutro e água, por espécime (Figura 9)

Figura 9 – **A)** Escova Tek recendo 1 gota de sabão neutro para realizar a escovação; **B)** Escovação do espécime com sabão neutro por 20 segundos.

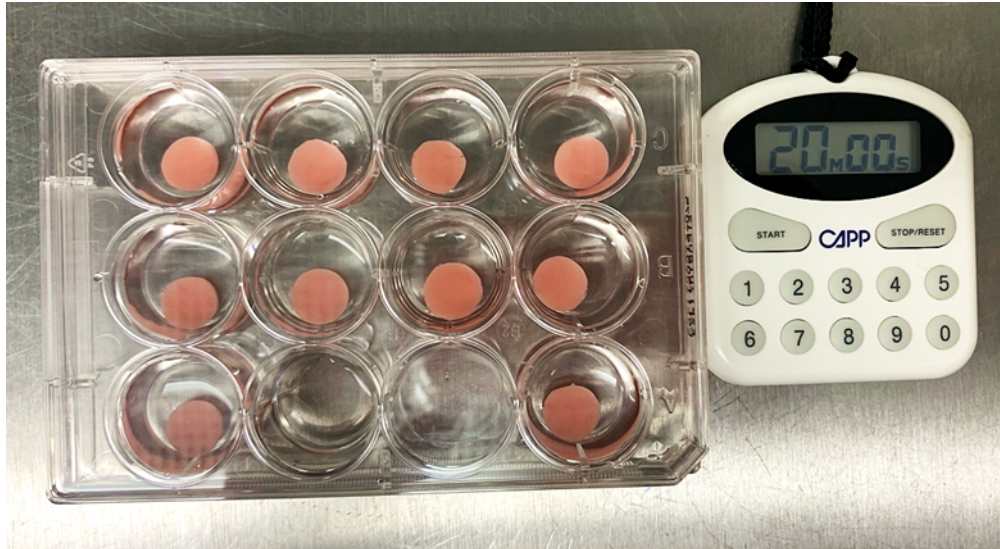


Após a escovação, os corpos de prova foram removidos com auxílio de uma pinça estéril, enxaguados 3 vezes em PBS, com o intuito de remover o resíduo do sabão. Em seguida, os corpos de prova foram imersos em 5mL de água por 20 minutos, volume suficiente para imersão total de cada espécime. Posteriormente, foram enxaguados 3 vezes em PBS e inseridos, individualmente, em tubos de polipropileno de 50 mL, devidamente identificados, contendo 5 mL de meio Letheen Broth. O mesmo procedimento foi realizado com os corpos de prova não contaminados (controle negativo).

G2 e G3 - Escovação associada à imersão em Triclosan a 0,15% ou Hipoclorito de Sódio 0,25% (NaOCl 0,25%), respectivamente: após o procedimento de escovação como descrito acima, os corpos de prova foram enxaguados 3 vezes com PBS e foram colocados em tubos de polipropileno de 50 mL, devidamente identificados, contendo 5 mL de uma das soluções desinfetantes para imersão por 20 minutos (Figura 10). Em seguida, os corpos de prova foram novamente lavados com PBS por 3 vezes e colocados, individualmente, em tubos de polipropileno de 50 mL, devidamente identificados, contendo 10 mL de meio Letheen Broth.

Após este processo, os tubos foram levados a cuba ultrassônica, agitados em agitador de tubos e as suspensões resultantes foram diluídas e semeadas em meio de cultura como descrito anteriormente. A contagem das UFC e mensuração da carga microbiana foram realizadas de acordo com o descrito no item 3.1.

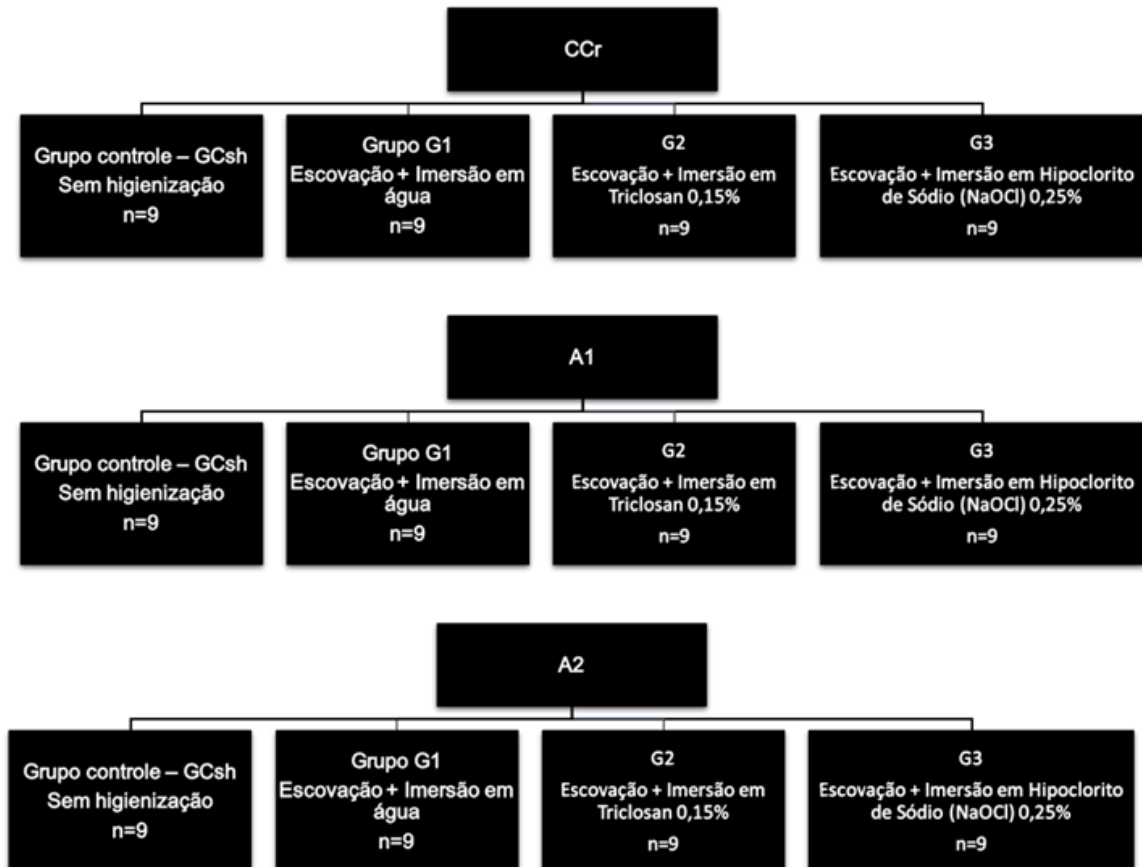
Figura 10 – Imersão dos corpos de prova em uma das soluções por 20 minutos.



3.5 Avaliação do Metabolismo Celular dos micro-organismos em biofilme misto

Os grupos foram formados de acordo com o fluxograma 3.

Fluxograma 3 – Formação dos grupos para análise do metabolismo celular.



Os espécimes com biofilme foram submetidos ao ensaio de redução do sal de tetrazólio (XTT) [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida] para avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos não eliminados pelo procedimento de higiene descrito no item 3.2. O teste baseia-se na habilidade das enzimas desidrogenase mitocondriais de micro-organismos metabolicamente ativos converterem o sal tetrazólio hidrossolúvel (cor amarela) em um produto solúvel em água - formazan (cor laranja). Assim, a redução bioquímica observada no ensaio, pode ser empregada para medir a atividade metabólica de biofilmes por meio da variação colorimétrica em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific) (DA SILVA et al., 2008).

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

Os espécimes com biofilme submetidos aos protocolos de higiene foram transferidos para placa de cultura de células com 24 poços, cada um contendo 1,2 mL de solução composta de 948 µL de PBS suplementado com 100 mM de glicose (Sigma-Aldrich) e 252 µL de solução de XTT e menadiona previamente preparada (Figura 11). As placas foram cobertas com folha de alumínio e mantidas no escuro a 37°C durante 2 horas. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram gentilmente agitadas e 100 µL da solução de cada poço e foram transferidos para placas de 96 poços, em duplicata e duas leituras da absorbância foram obtidas a 492 nm e a média foi registrada (Figura 12).

Figura 11 – Placa de 24 poços com os espécimes em posição após os protocolos de higiene para o ensaio de XTT.

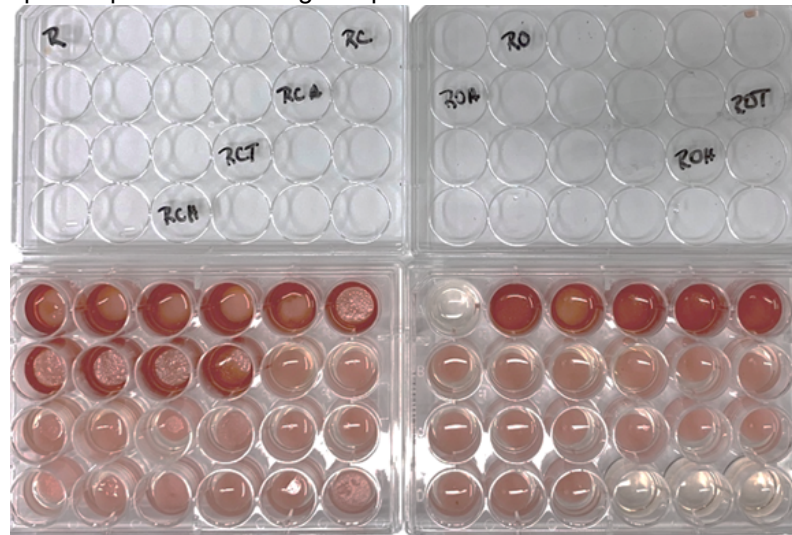
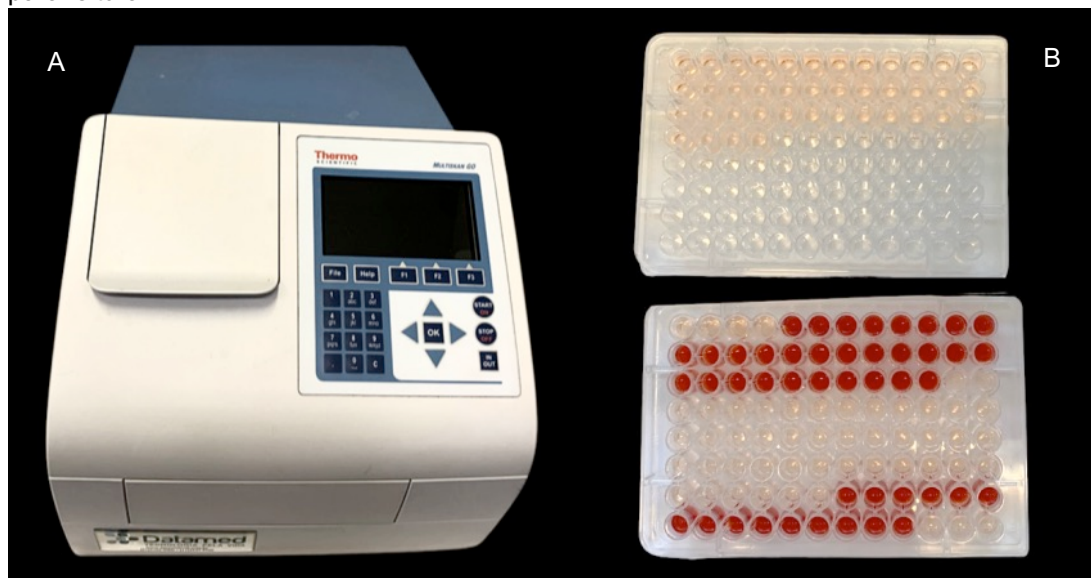


Figura 12 – A) Leitor de microplacas; B) Placa de 96 poços contendo 100 μ L da solução para leitura.



3.6 Avaliação da força de adesão dos adesivos A1 e A2 após aplicação em corpos de prova de resina acrílica.

Este ensaio foi realizado com 15 corpos de prova para cada adesivo e tempo de análise. Sobre uma das extremidades dos corpos de prova, foi fixado um pedaço de pele suína, com as mesmas dimensões do diâmetro da superfície, para simular a mucosa (FALLAHI, et al., 2018). A fixação da pele à superfície da resina foi feita com o uso de um adesivo instantâneo a base de cianoacrilato (Loctite, SuperBonder, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil) (Figura 13). Após a fixação da pele, elas foram umedecidas com 5 mL de saliva artificial para simular a umidificação da

mucosa. Foram pesados 0,5 g de adesivo em balança de precisão (Mettler Toledo, Greifensee, Suíça) e foram aplicados uniformemente na extremidade de outro corpo de prova, de acordo com as instruções dos fabricantes (Figura 14). Em seguida, os corpos de prova foram posicionados na máquina de ensaios mecânicos (EMIC DL 2000, São José dos Pinhais, PR, Brasil) para realização do ensaio de compressão. Foi aplicado uma força de compressão de 12 N (1,2 kg de peso) por 30 segundos para simular uma força oclusal suave (HARALDSON et al.,1979) (Figura 15). O ensaio de tração foi realizado em diferentes tempos, sendo imediatamente (T0) após a compressão, após 5 minutos (T5 min) e 4 horas (T4 h). Os corpos de prova foram mantidos em ambiente umidificado com saliva artificial até o momento do ensaio de tração. O conjunto foi deslocado em modo de tração a uma velocidade de 1 mm por minuto usando a máquina universal de ensaios, e a força máxima foi calculada em Newton (N) (Figura 16).

Figura 13 – Corpo de prova cilíndrico revestido com a pele suína.



Figura 14 – Corpo de prova contendo 0,5 gramas de adesivo.



Figura 15 – Aplicação da força de compressão de 12 N por 30 segundos.

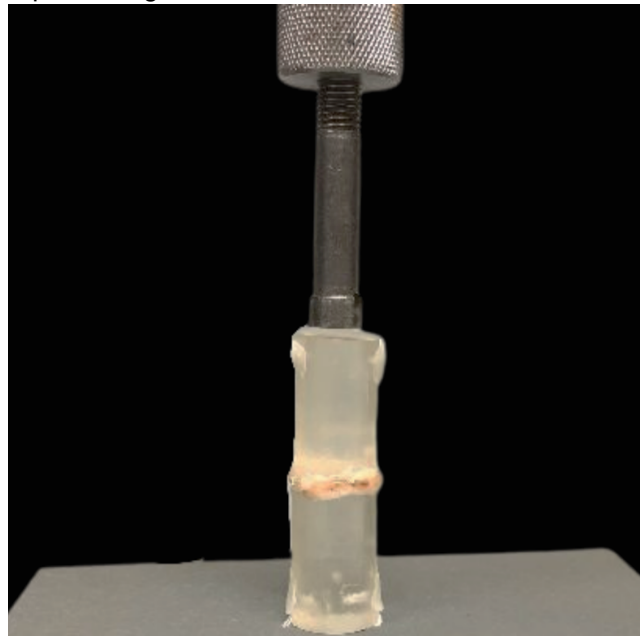
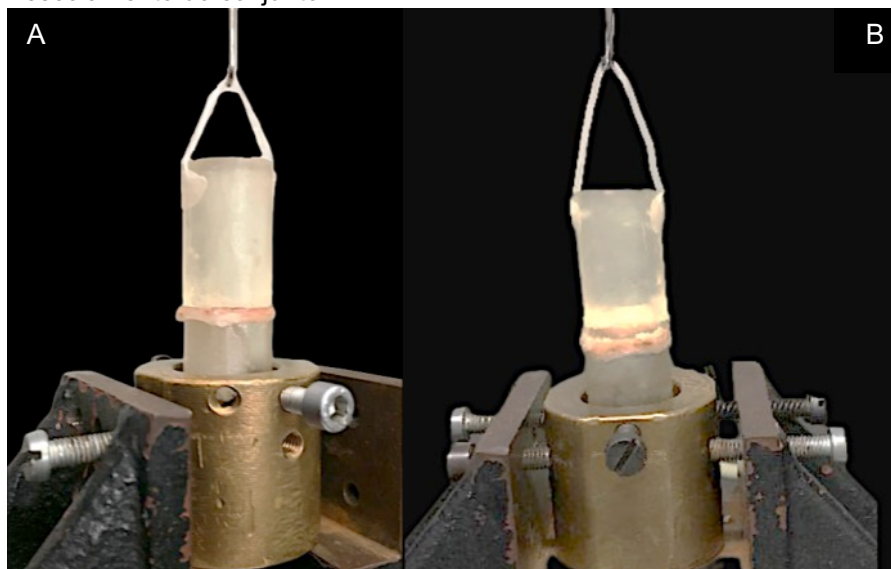


Figura 16 – A) Ensaio de tração a uma velocidade de 1mm por minuto; **B)** Descolamento do conjunto.



3.7 Análise dos Dados

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (Teste de Shapiro-Wilks) e homocedasticidade (Teste de Levene). Com base nos resultados deste teste, a análise estatística foi conduzida da seguinte forma:

1. Para avaliação do efeito dos adesivos sobre a formação de biofilme foi empregado o Teste Anova (One-way) com pós-teste de Tukey;
2. Para avaliação do efeito dos protocolos de higiene contra *C. albicans*, *C. glabrata* e efeito dos protocolos sobre a carga microbiana o metabolismo celular do biofilme misto, foi empregado o Modelo linear generalizado com ajuste de Bonferroni;
3. Para avaliação do efeito dos protocolos de higiene sobre a carga microbiana de contra *S. aureus* e *S. mutans*, foi empregado Teste Anova (Two-way) e pós teste de Tukey;
4. A comparação das médias da força de adesão entre os adesivos e a resina acrílica foi realizada por meio do Teste Anova com medidas repetidas e pós teste de Tukey.

As análises foram conduzidas com auxílio do Software estatístico SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) com nível de confiança de 95% ($\alpha = 5\%$).

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Formação de biofilme

A tabela 2 apresenta a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC+1Log₁₀) de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans* sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica (GC) e na presença dos adesivos Ultra Corega Creme (A1) ou OlivaFix® Gold (A2).

Tabela 2 – Contagem de UFC+1 (Log₁₀) de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans* na superfície de corpos de prova em resina acrílica (GC), com adesivos Ultra Corega Creme (A1) ou OlivaFix® Gold (A2).

	N	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>
GCr	1	4,88	4,72	7,95	5,47
	2	4,60	4,75	6,23	5,67
	3	4,72	4,60	7,97	5,23
	4	4,75	4,68	7,98	5,49
	5	4,86	4,60	7,93	5,11
	6	4,60	3,60	7,41	6,28
	7	3,60	4,38	7,18	5,86
	8	4,20	3,90	7,26	5,51
	9	3,60	4,20	4,78	6,08
	10	4,30	4,60	6,87	5,94
A1	1	3,60	4,56	6,92	6,13
	2	3,60	4,51	5,68	7,01
	3	4,08	4,64	5,20	6,09
	4	3,60	4,86	7,39	6,23
	5	4,30	4,75	6,97	6,28
	6	4,81	5,65	6,50	6,58
	7	4,20	4,08	6,20	6,19
	8	4,20	5,00	7,08	6,51
	9	3,60	5,55	7,08	6,56
	10	4,30	5,71	8,70	6,98
A2	1	4,98	5,68	7,91	6,19
	2	4,64	4,92	8,99	6,32
	3	4,30	4,68	7,45	5,98
	4	5,11	5,74	8,82	7,47
	5	5,08	5,41	9,31	7,27
	6	5,78	5,78	7,17	6,98
	7	5,30	5,57	7,51	7,39
	8	5,59	4,94	5,96	7,28
	9	4,77	5,57	5,91	6,26
	10	5,17	5,65	6,46	6,47

Para *C. albicans* houve maior carga microbiana quando da utilização do adesivo A2, com diferença significativa com o GCr e A1, os quais foram iguais entre si. Para *C. glabrata* e *S. mutans*, a presença dos adesivos A1 e A2 proporcionou maior contagem de UFC se comparado ao controle; a carga microbiana desses micro-organismos foram semelhantes quando ao uso de A1 e A2 e estatisticamente

diferente do grupo controle. A contagem de UFC de *S. aureus* não foi influenciada pela presença ou ausência de adesivo ou tipo de adesivo, não havendo diferença entre as três condições avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação das médias (DP) da contagem de UFC+1 (Log₁₀) de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans* presentes na superfície de corpos de prova em resina acrílica (GCr), com adesivo Ultra Corega Creme (A1) ou OlivaFix® Gold (A2).

		<i>C. albicans</i>	*p	<i>C. glabrata</i>	*p	<i>S. aureus</i>	*p	<i>S. mutans</i>	*p
GCr	Média	4,41 ^a		4,40 ^a		7,15		5,66 ^a	
	DP	0,48		0,38		1,01		0,37	
A1	Média	4,02 ^a	<0,000	4,93 ^b	<0,000	6,77	0,287	6,45 ^b	<0,000
	DP	0,415		0,54		0,96		0,33	
A2	Média	5,07 ^b		5,39 ^b		7,54		6,76 ^b	
	DP	0,43		0,39		1,22		0,51	

*Teste Anova (One-way); Letras iguais indicam igualdade estatística entre GCr, A1 e A2 para o mesmo micro-organismo.

4.2 Ação antimicrobiana dos protocolos de higiene escovação com imersão em Água (G1), Triclosan 0,15% (G2) e Hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).

A tabela 4 apresenta a contagem de UFC+1 (Log₁₀) de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans* sobre a superfície de corpos de prova com os adesivos A1 e A2 do grupo sem higienização (GCsh), após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3). As tabelas 4 a 7 apresentam a comparação dos resultados da efetividade dos protocolos de higiene.

Tabela 5 – Comparação da contagem de UFC+1/mL (Log₁₀) de *C. albicans* com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix Gold® (A2) do grupo controle (sem higienização) e após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).

		Controle	(G1)	(G2)	(G3)
(A1)	Média	4,03 Aa	2,53 Ba	1,48 Ba	
	DP	0,41	1,00	0,86	*
	Mediana	4,14	2,66	1,61	
	IC	3,73-4,32	1,82-3,24	0,86-2,09	
OlivaFix (A2)	Média	5,07 Aa	2,21 Ba	0,60 Ca	
	DP	0,44	0,93	1,02	*
	Mediana	5,09	2,55	0,0	
	IC	4,75-5,38	1,54-2,87	-0,12-1,320	
**p		0,065	1,00	0,236	

*Reduziu a zero a carga microbiana: não entrou na estatística; **Modelo linear generalizado com ajuste de Bonferroni. A1: GCshxG1: p=0,001; GCshxG2: p=0,000; G1xG2: p=0,060; A2: GCshxG1: p=0,000; GCshxG2: p=0,000; G1xG2: p=0,000; Letras iguais indicam igualdade estatística; Letras maiúsculas comparam grupos para o mesmo adesivo; letras minúsculas comparam adesivos para o mesmo grupo.

A comparação das médias indicou interação entre os fatores (p=0,001); não houve diferença significativa entre adesivo (p=0,799); houve diferença entre protocolos de higiene (p=0,000). Os protocolos de higiene reduziram de forma significativa a carga microbiana de *C. albicans* se comparado com o controle quando usados com os dois adesivos. Com adesivo A1, os grupos G1 e G2 reduziram a contagem de UFC de *C. albicans* de forma semelhante. Com o adesivo A2, o grupo G2 foi mais eficiente. Comparando os adesivos entre si não houve diferença na ação antimicrobiana dos protocolos.

Tabela 6 – Comparação da contagem de UFC+1/mL (Log₁₀) de *C. glabrata* com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) do grupo controle (GCsh) e após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).

		GCsh	(G1)	(G2)	(G3)
(A1)	Media	4,93 Aa	2,52 Ba	2,41 Ba	
	DP	0,54	0,97	1,21	*
	Mediana	4,80	2,65	2,37	
	IC	4,54-5,32	1,82-3,21	1,54-3,27	
(A2)	Média	5,39 Aa	2,39 Ba	1,06 Cb	
	DP	0,40	0,21	1,15	*
	Mediana	5,57	2,38	0,95	
	IC	5,11-5,67	2,24-2,53	0,23-1,88	
**p		1,00	1,00	0,005	

* Reduziu a zero a carga microbiana: não entrou na estatística; **Modelo linear generalizado com ajuste de Bonferroni; A1: GCshxG1: p=0,000; GCshxG2: p=0,000; G1xG2: p=1,000; A2: GCshxG1: p=0,000; GCshxG2: p=0,000; G1xG2: p=0,006; Letras iguais indicam igualdade estatística; Letras maiúsculas comparam grupos para o mesmo adesivo; letras minúsculas comparam adesivos para o mesmo grupo.

A comparação das médias indicou interação entre os fatores (p=0,002); não houve diferença significativa entre adesivo (p=0,116); houve diferença entre protocolos de higiene (p=0,000). Os protocolos de higiene reduziram de forma

significativa a contagem de UFC de *C. glabrata* se comparado com o controle. Com o adesivo A1, não houve diferença entre os grupos G1 e G2. Com o adesivo A2, o G2 causou maior redução da carga microbiana de *C. glabrata* se comparado ao G1. Comparando os adesivos, nos grupos GCsh e G1 não houve diferença entre eles, mas para o adesivo A2, o protocolo G2 promoveu maior redução na contagem de UFC de *C. glabrata*.

Tabela 7 – Comparação da contagem de UFC+1/mL (Log10) de *S. aureus* com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) do grupo controle (sem higienização) e após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).

		GCsh	(G1)	(G2)	(G3)
(A1)	Média	6,77 Aa	5,24 Ba	3,66 Ca	0,54 Da
	DP	0,97	0,44	1,38	1,24
(A2)	Média	7,55 Aa	5,24 Ba	2,68 Cb	0,00 Da
	DP	1,23	0,55	0,57	0,00
*p		0,062	0,994	0,020	0,193

*Anova (Two-way); A1: GCshxG1: p=0,002; GCshxG2: p=0,000; GCxG3: p=0,000; G1xG2: p=1,001; G1xG3: p=0,000; G2xG3: p=0,000; A2: GCshxG1: p=0,000; GCshxG2: p=0,000; GCxG3: p=0,000; G1xG2: p=0,000; G1xG3: p=0,000; G2xG3: p=0,000; Letras iguais indicam igualdade estatística; Letras maiúsculas comparam grupos para o mesmo adesivo; letras minúsculas comparam adesivos para o mesmo grupo.

A comparação das médias indicou interação entre os fatores (p=0,022); não houve diferença significativa entre adesivo (p=0,370); houve diferença entre protocolos de higiene (p=0,000). Os protocolos de higiene reduziram de forma significativa a carga microbiana de *S. aureus* se comparado com o controle. Com ambos adesivos, todos os protocolos foram estatisticamente diferentes entre si, com maior redução da contagem de UFC pelo G3, seguido de G2 e G1. Comparando os adesivos, o grupo G2 promoveu maior redução de UFC de *S. aureus* com o adesivo OlivaFix® Gold. Para os demais grupos, não houve diferença. Para os demais grupos, não houve diferença entre os adesivos.

Tabela 8 – Comparação da contagem de UFC+1/mL (Log_{10}) de *S. mutans* com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) do grupo controle (sem higienização) e após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).

		CGsh	(G1)	(G2)	(G3)
(A1)	Média	6,46 Aa	4,33 Ba	1,10 Ca	
	DP	0,33	0,43	1,54	*
(A2)	Média	6,76 Aa	3,77 Ba	0,00 Cb	*
	DP	0,57	0,37	0,00	
p		0,349	0,087	0,001	

*Reduziu a zero o crescimento: não entrou na estatística; **Anova (two-way) e pós teste de Tukey; A1: GCshxG1: $p=0,000$; GCshxG2: $p=0,000$; G1xG2: $p=0,000$; A2: GCshxG1: $p=0,000$; GCshxG2: $p=0,000$; G1xG2: $p=0,000$; Letras iguais indicam igualdade estatística; Letras maiúsculas comparam grupos para o mesmo adesivo; letras minúsculas comparam adesivos para o mesmo grupo.

A comparação das médias indicou interação entre os fatores ($p=0,012$); houve diferença significativa entre adesivo ($p = 0,018$) e protocolos de higiene ($p=0,000$). Os protocolos de higiene reduziram de forma significativa a carga microbiana de *S. mutans* se comparado com o controle. O G2 foi significativamente mais efetivo seguido do G1 para os dois adesivos. Comparando os adesivos entre si, o grupo G2 promoveu inibição total do crescimento de *S. mutans* com o adesivo OlivaFix® Gold.

4.3 Metabolismo celular do biofilme misto

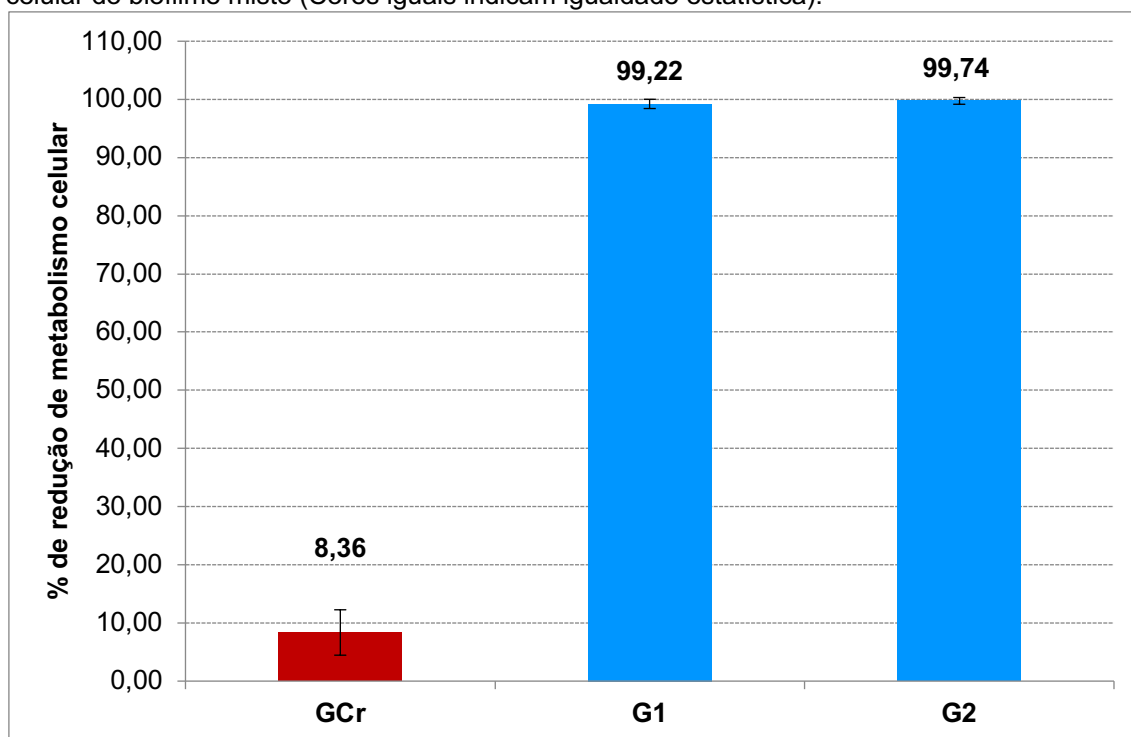
A tabela 9 apresenta o metabolismo celular [(Absorbância em nM e porcentagem (%) de redução do metabolismo)] do biofilme misto após exposição aos protocolos de higiene associado escovação após exposição aos protocolos de higiene associando escovação em Água (G1); Triclosan 0,15% (G2) e Hipoclorito de sódio a 0,25% (G3) e sem higienização (GCsh), sobre a superfície de corpos de prova em resina acrílica na presença Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2).

Tabela 9 – Metabolismo celular [(Absorbância em nM e porcentagem de redução do metabolismo (%)] do biofilme misto na superfície da resina acrílica (CGr) e em associação aos adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) no grupo sem higienização (GCsh), após exposição à escovação e imersão em água (G1), em Triclosan a 0,15% (G2) e em hipoclorito de sódio a 0,25% (G3).

	GCr		GCsh			G1			G2			G3
	nM	%	nM	%	% de redução	nM	%	% de redução	nM	%	% de redução	nM
(A1)	5,05	100,00	4,58	90,77	9,23	0,12	2,43	97,57	0,06	1,13	98,87	0,00
	4,86	100,00	4,58	94,29	5,71	0,09	1,88	98,12	0,11	2,31	97,69	0,00
	5,06	100,00	4,91	97,03	2,97	0,07	1,40	98,60	0,01	0,12	99,88	0,00
	5,07	100,00	4,18	82,55	17,45	0,10	1,94	98,06	0,02	0,34	99,66	0,00
	3,22	100,00	2,89	89,73	10,27	0,04	1,39	98,61	0,00	0,00	100,00	0,00
	3,22	100,00	3,01	93,41	6,59	0,00	-0,01	100,01	0,00	0,00	100,00	0,00
	3,22	100,00	3,00	93,16	6,84	0,01	0,39	99,61	0,00	0,00	100,00	0,00
	3,13	100,00	2,95	94,21	5,79	0,03	1,02	98,98	0,00	0,00	100,00	0,00
	3,12	100,00	2,80	89,57	10,43	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	100,00	0,00
(A2)	5,05	100,00	4,70	93,05	6,95	0,08	1,55	98,45	0,00	0,00	100,00	0,00
	4,86	100,00	3,96	81,59	18,41	0,00	0,00	100,00	0,01	0,24	99,76	0,00
	5,06	100,00	3,74	73,96	26,04	0,00	0,00	100,00	0,01	0,23	99,77	0,00
	5,07	100,00	3,76	74,24	25,76	0,00	0,00	100,00	0,01	0,15	99,85	0,00
	3,22	100,00	3,21	99,85	0,15	0,02	0,51	99,49	0,00	0,13	99,87	0,00
	3,22	100,00	2,38	73,86	26,14	0,01	0,24	99,76	0,00	-0,02	100,02	0,00
	3,22	100,00	3,14	97,80	2,20	0,02	0,54	99,46	0,00	0,00	100,00	0,00
	3,13	100,00	3,06	97,67	2,33	0,02	0,53	99,47	0,00	0,00	100,00	0,00
	3,12	100,00	2,91	93,27	6,73	0,00	0,16	99,84	0,00	0,00	100,00	0,00

A figura 17 mostra a comparação das médias (DP) da porcentagem (%) de redução do metabolismo celular do biofilme misto. Houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,000$). Não houve diferença entre os adesivos ($p=0,124$) ou interação entre grupos e adesivos ($p=0,260$). Os micro-organismos não apresentaram metabolismo celular no grupo. Os grupos e foram semelhantes entre si e causaram diminuição significativamente maior que o grupo sem higienização (controle).

Figura 17 – Comparação das médias (DP) da porcentagem (%) de redução do metabolismo celular do biofilme misto (Cores iguais indicam igualdade estatística).



4.4 Força de adesão dos adesivos Ultra Corega Creme e OlivaFix® Gold após aplicação em corpos de prova de resina acrílica.

A tabela 10 apresenta os valores da força de adesão (N) entre os copos de prova com adesivo A1 e A2, imediatamente após a aplicação e após 5 minutos e 4 horas.

Tabela 10 – Valores de força de adesão (N) entre os corpos de prova em resina acrílica com os adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2) imediatamente após a aplicação do adesivo (T0) e após 5 minutos (T5 min) e 4 horas (T4 h).

A1			A2		
T0	T5 min	T4 h	T0	T5 min	T4 h
1,9	3,29	4,00	2,08	4,52	2,89
2,33	3,79	3,34	2,11	3,60	6,21
3,16	3,02	4,25	2,71	5,23	6,58
2,13	3,17	5,77	1,77	3,09	5,49
2,49	3,96	5,55	1,76	3,34	7,35
1,85	2,83	4,92	1,64	7,10	5,35
3,24	2,47	3,87	1,61	2,80	10,15
2,77	2,79	6,37	1,29	11,98	18,35
2,36	3,42	2,27	2,46	4,87	14,82
1,81	2,67	4,02	1,69	3,86	7,51
2,9	3,17	5,42	2,22	4,67	2,80
3,23	2,73	5,49	2,46	9,63	15,70
2,1	4,69	2,79	1,72	8,87	2,68
1,92	3,50	4,58	1,43	7,06	4,94
2,44	2,77	6,77	2,28	3,75	5,12

A força de adesão sofreu influência significativa pela interação entre adesivo e tempo ($p=0,007$). Imediatamente após a aplicação dos adesivos, a força de adesão foi maior para o adesivo A1, porém, após 5 minutos e 4 horas de aplicação, a força foi maior para o adesivo A2. Para o adesivo A1, a força aumentou significativamente com a passagem do tempo, sendo que T5 min foi maior que em T0 e em T4 h foram maiores que em T5 min. Para o adesivo A2 a força aumentou de forma significativa entre T0 e T5 min; entre T5 min e T4 h não foi detectada diferença significativa (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparação das médias (DP) da força de adesão (N) entre os corpos de prova com adesivos Ultra Corega Creme (A1) e OlivaFix® Gold (A2), imediatamente (T0) após a aplicação e após 5 minutos (T5 min) e 4 horas (T4 h).

	T0	T5 min	T4 h	*p
A1	2,44 (0,51) Aa	3,21 (0,58) Ba	4,62 (1,29) Ca	0,007
A2	1,94 (0,41) Ab	5,62 (2,73) Bb	7,72 (4,88) Bb	

*Análise de variância com medidas repetidas, Letras maiúsculas: comparação entre tempos para o mesmo adesivo; Letras minúsculas: comparação entre adesivos para um mesmo tempo; Letras iguais: indicam igualdade estatística.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Embora a odontologia tenha evoluído ao longo das décadas e os estudos com implantes para reabilitação de indivíduos desdentados totais apresentam altos índices de sucesso, a sua indicação pode ser limitada em função de custos, condições sistêmicas e disposição do paciente (FEINE et al., 2002; WALTON, MACENTEE, 2005; ASSUNÇÃO et al., 2007; de SOUZA et al., 2015; MUNDT et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015). Assim, frente a necessidade de indicações e orientações relacionadas ao uso dos adesivos de próteses como alternativa para casos em que a instalação de implantes não é viável e/ou as próteses totais, mesmo que bem executadas, possam não atender às expectativas do paciente, muitos questionamentos são passíveis de serem feitos quanto ao tipo a ser indicado e orientações de uso aos pacientes.

Ainda que a utilização de adesivos de próteses possa promover conforto, confiança e satisfação (TORRES-SÁNCHEZ et al., 2018; MOUNIR ATASSI et al., 2019), o custo das marcas comerciais disponíveis é alto para aqueles que necessitam de uso contínuo e a dificuldade de remoção do adesivo da superfície de resina é uma queixa comum, principalmente para indivíduos com baixa destreza manual (PADILHA et al., 2007; POLYCHRONAKIS et al., 2021). Este fato é importante uma vez que, resíduos de material podem favorecer a proliferação de micro-organismos com organização de biofilme (LEITE et al., 2014; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2018; COSTA et al., 2021), havendo necessidade de orientações específicas quanto aos protocolos de higiene para controle a microbiota e prevenção de infecções.

Para o presente estudo foi empregado biofilme misto composto por *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus* e *S. mutans* por serem micro-organismos frequentemente isolados de biofilme de prótese total e empregados como indicadores de atividade antimicrobiana de soluções desinfetantes para prótese total (de ANDRADE et al., 2011; PANARIELLO et al., 2016; COIMBRA et al., 2016; BADARÓ et al., 2017). *C. albicans* é a espécie mais frequente e *C. glabrata* é comumente isolada em indivíduos com estomatite relacionada à prótese ERP (COCO et al., 2008; YANO et al., 2019; BADARÓ et al., 2020; MOUSA et al., 2020). Além disso, a literatura indica que *C. albicans* desenvolve biofilme denso e em multicamadas com hifas intrincadas como suporte para adesão de *C. glabrata* (LI et

al., 2019). *S. aureus* está comumente relacionado entre agentes causadores de infecções nosocomiais com risco de vida para indivíduos com enfermidades e imunocomprometidos. Ainda, Leoney et al. (2020) avaliaram o biofilme coletado de próteses totais de 30 indivíduos sem doenças sistêmicas crônicas e verificaram que entre 10 isolados de *S. aureus*, 10% eram formadores de biofilme fracos, 30% eram formadores de biofilme moderado, enquanto 60% eram fortes formadores de biofilme, indicando que a prótese é um reservatório importante de bactérias patogênicas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2017), o controle de *S. aureus* é considerado de alta necessidade em função da resistência a antibióticos, tornando-o de difícil controle. *S. mutans* é precursor na formação de biofilme e convive em simbiose com outros micro-organismos patogênicos da prótese total, o que é clinicamente significativo, pois pacientes idosos com sistema imunológico comprometido são mais propensos a desenvolver infecções sistêmicas como endocardite bacteriana (NEDUMGOTTIL, 2021). Ainda, é um microrganismo relacionado ao mau odor em usuários de prótese total (POLYSOIS et al., 2013).

A hipótese nula do estudo foi rejeitada, uma vez que, para o ensaio de formação de biofilme, houve diferença entre os adesivos para a carga microbiana de *C. albicans*; houve diferença entre os protocolos de higiene na redução da carga microbiana e variação de acordo com o adesivo; houve diferença entre a força adesiva promovida pelos adesivos avaliados.

5.1 Formação de Biofilme

Análises da influência de adesivos sobre a formação de biofilme, por meio de estudo *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2010; SAMAPAIIO-MAIA et al., 2012; CARTAGENA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2018; OLIVERIA Jr. et al. 2018; CASTRO et al., 2020), e *in vivo* (POLYZOIS et al., 2013; LEITE et al., 2014; AZEVEDO et al., 2021), têm sido realizadas e a quantificação da carga microbiana, por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) é comumente empregada.

Os resultados mostraram que a carga microbiana do biofilme formado foi influenciada pela presença de adesivo quando comparado ao controle, exceto para *C. albicans* associada ao adesivo Ultra Corega Creme, onde a contagem foi semelhante ao controle (GCr) e inferior à do OlivaFix® Gold. Para *C. glabrata*, a formação de biofilme foi significativamente maior com os adesivos se comparado ao

controle. Uma hipótese para a diferença de *C. albicans* e *C. glabrata* frente ao adesivo A1 pode estar relacionada à adesão e conseqüentemente à hidrofobicidade da superfície celular (HSC), a qual pode sofrer variações ambientais (FIDEL et al., 1999) e pode ter sido influenciada pelo tipo de adesivo. Em um estudo com número limitado de isolados de *C. glabrata*, foi verificado que essa espécie demonstrou ter HSC comparável a *C. albicans* (HAZEN et al., 1986). Entretanto, quando um grande número de isolados de *C. glabrata* foi avaliado, verificou-se que a HSC de *C. albicans* foi sensível a condições específicas de crescimento, enquanto a HSC dos isolados de *C. glabrata* foi relativamente resistente às mesmas condições (HAZEN et al., 1986), sugerindo que *C. glabrata* não é tão sensível ou influenciado por fatores ambientais. Porém, esse apontamento deve ser interpretado com cautela visto que outro estudo não identificou diferença no comportamento de aderência das duas espécies frente às alterações ambientais (KLOTZ et al., 1985). O conhecimento epidemiológico e patogênico referente a *C. albicans* é muito bem estabelecido na literatura, porém, poucos são os estudos que visam entender o comportamento e características de *C. glabrata* (FIDEL et al., 1999).

A média de UFC de *C. albicans* no biofilme formado com Ultra Corega Creme foi semelhante ao controle, indicando que esse adesivo não promoveu a proliferação exacerbada do microrganismo, porém, também não causou inibição. Estes resultados corroboram com os observados por Leite et al. (2014) e Oliveira Jr. et al. (2018). Alguns estudos avaliaram o crescimento de *C. albicans* na presença ou ausência de adesivos e em comparação a diferentes marcas e forma de apresentação. Costa et al. (2021) verificaram aumento na contagem de *C. albicans* quando o biofilme foi formado com Corega Fita e Corega Pó, se comparado ao Ultra Corega Creme ; porém, em relação ao controle (sem adesivo), as três formas de apresentação foram relacionadas a maior carga microbiana. Entretanto, no estudo de Sampaio-Maia et al. (2011), o adesivo Ultra Corega Creme causou inibição de 42% no crescimento de *C. albicans* quando comparado a outros adesivos, que não influenciaram a carga microbiana. Os resultados discordantes podem ser explicados pela metodologia empregada, onde os autores avaliaram o crescimento de *C. albicans* em solução de 1% dos adesivos em meio de cultura líquido.

A maior contagem de UFC de *C. albicans* no adesivo OlivaFix® Gold pode estar relacionada à formação de uma película altamente viscosa sobre os corpos de prova, a qual pode ter impactado na capacidade de adesão. Estes resultados vão de

encontro com Azevedo et al. (2021) que observaram que houve inibição no crescimento de *C. albicans* na presença do adesivo OlivaFix® Gold em um período de 48 horas e que durante 5 dias e 7 dias cresceu de forma lenta e com diferenças estatisticamente significativas quando comparando aos outros grupos (Adesivo de controle - Kukident Pro® e Adesivo placebo - Vaselina, Senti2®).

Com relação ao *S. aureus*, não foi detectada diferença na carga microbiana quando comparados os adesivos entre si e com o controle (sem adesivo). Este resultado corrobora com Ozkan et al., (2012) que verificaram, por meio de um estudo clínico, não haver diferença na contagem de UFC de *S. aureus* isolados de biofilme de próteses totais utilizadas com e sem adesivo. Porém, Costa et al. (2021) observaram que houve maior crescimento de *S. aureus* nos adesivos estudados (Corega Strip, Corega Ultra Powder, Ultra Corega Creme, grupo controle).

Os resultados do presente estudo indicaram maior carga microbiana de *S. mutans* na presença dos dois adesivos quando comparado ao controle. Estes resultados contrariam a literatura, uma vez que alguns estudos indicam que a carga microbiana de *S. mutans* não foi alterada pela presença de adesivo (CHEN et al., 2013; LEITE et al., 2014). De acordo com Chen et al. (2013) a estabilidade do pH das soluções com adesivos, ao longo de 24 h, variando de 5,5 a 7,0 pode ter colaborado para não detecção de diferenças estatisticamente significativas nas taxas de crescimento de *S. mutans* entre o extrato com adesivo e controle (sem adesivo). Por outro lado, Polyzois et al. (2013) investigaram por meio de estudo *in vitro*, a eficácia antimicrobiana de três adesivos comerciais (Corega Ultra®, Fixodent Pro Original® e Biotene® DentureGrip) contra quatro micro-organismos relacionados com o mau odor oral *in vitro* (*S. oralis*, *S. mutans*, *P. oralis* e *F. nucleatum*) e relataram que todos os adesivos testados mostraram efeitos antimicrobianos, porém com variações quanto à efetividade, e atribuíram a ação antimicrobiana do Corega Ultra à presença de sódio/magnésio e zinco em sua formulação. A diferença de resultados do presente estudo com os de Polyzois et al. (2013) pode ser devido à diferença na formulação dos adesivos da marca Corega utilizados e com os demais estudos devido às diferenças no tipo de adesivos usados, modelo de biofilme e metodologia empregada.

De modo geral, era esperado encontrar menor carga microbiana de todas as espécies de micro-organismos testados quando expostos ao adesivo à base de óleo de oliva, um polifenol que tem demonstrado uma série de efeitos biológicos

positivos, incluindo ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antialérgica. Sua ação antimicrobiana tem sido estudada como forma de prevenir contaminações bacterianas alimentares (BISIGNANO et al., 1999; THIELMANN et al. 2017; GUO et al., 2019 e 2020). Na odontologia, o óleo de oliva ozonizado tem sido avaliado, in vitro, como agente antimicrobiano e tem demonstrado efetividade contra *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans* e espécies não *albicans* (PIETROCOLA et al., 2018; NARDI et al., 2020; MONZILO et al., 2020; ZAKRZEWSKI et al., 2020). Verifica-se que, na odontologia, os estudos encontrados associam o óleo de oliva ao ozônio, o que poderia explicar os resultados do presente estudo.

Entretanto, pode-se considerar que, por apresentar uma formulação livre de derivados de petróleo e livre de zinco, com compostos naturais, em apresentando resultados antimicrobianos semelhantes ao adesivo comercial, pode-se considerar o adesivo à base de óleo de oliva, um adesivo seguro para indicação clínica.

5.2 Ação Antimicrobiana

A seleção dos protocolos de higienização do presente estudo foi fundamentada na literatura, a qual preconiza associação do método mecânico, especificamente a escovação, ao químico, pela imersão em soluções desinfetantes. Esta associação viabiliza a desorganização e remoção mecânica do biofilme e a ação antimicrobiana e remoção de manchas pelas soluções (PARANHOS et al., 2007; 2009).

Com relação às próteses que são utilizadas com adesivos diariamente, alguns estudos avaliaram diferentes protocolos de higiene, associando escovação com sabão de coco ou dentífrico com peróxido alcalino, enzimas, ácidos orgânicos, material antibacteriano inorgânico de prata, (celulase, Meicelase - Trichoderma) dissolvida em solução de peróxido alcalino ou enzimas, quanto à eficácia na remoção do adesivo e/ou quanto à atividade antimicrobiana e verificaram que, embora tenham detectado remoção do adesivo, não houve efeito antimicrobiano (HARADA-ADA et al., 2016; NUNES et al., 2016; HARADA-ADA et al., 2017).

Frente à escassez de estudos que encontraram resultados favoráveis quanto à inibição da microbiota pelos métodos de higiene empregados, os resultados do presente estudo são promissores, uma vez que a associação da escovação com as imersões nas soluções promoveu redução da carga microbiana se comparado ao controle.

O protocolo com imersão em hipoclorito de sódio a 0,25% inibiu completamente o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*, e para *S. aureus*, reduziu significativamente a contagem de UFC se comparado ao controle e demais grupos com o adesivo Ultra Corega Creme e impediu o crescimento de *S. aureus* provenientes das amostras de OlivaFix® Gold. O hipoclorito de sódio é um agente oxidante e seu alto pH interfere na integridade da membrana citoplasmática causando inibição enzimática irreversível, alterações biossintéticas no metabolismo celular e degradação dos fosfolípidios (ESTRELA et al., 2002). Estudos demonstram que a imersão em hipoclorito de sódio a 0,25% foi eficaz na higienização das próteses totais convencionais pela inibição do crescimento de micro-organismos (ARAÚJO et al. 2021; BADARÓ et al. 2020; ARRUDA et al. 2018; ARRUDA et al. 2017; BADARÓ et al. 2017; SALLES et al. 2015). Além disso, embora uma das desvantagens do hipoclorito de sódio seja seu odor desagradável, na concentração de 0,25% foi bem aceito pelos pacientes (BADARÓ et al., 2017), podendo ser usado como controle positivo para avaliação de outras soluções (BADARÓ et al., 2021).

A escovação com imersão em Triclosan a 0,15% reduziu a contagem de UFC de *C. albicans* e *C. glabrata* de forma semelhante ao grupo de escovação e imersão em água com amostras provenientes do adesivo Ultra Corega Creme, porém, foi efetivo contra *S. aureus* e *S. mutans*, independente do adesivo. Já com o adesivo OlivaFix® Gold, pode-se observar que o Triclosan a 0,15% foi efetivo contra todos os micro-organismos. Uma possível interação entre os componentes presentes no adesivo OlivaFix® Gold com o Triclosan pode ter ocorrido e promovido sua maior efetividade. O Triclosan é um agente antimicrobiano, sintético solúvel em lipídios, de amplo espectro ativo contra uma variedade de micro-organismos como bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*), bactérias Gram-negativas, bem como fungos e leveduras. Tem sido usado nos Estados Unidos e globalmente por mais de 40 anos como antisséptico, desinfetante ou conservante. Em baixas concentrações, o Triclosan inibe as enzimas responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos (FabI ou InhA (2-trans-enoil-acil carreadora de proteína redutase) formando um complexo não covalente com NAD⁺ de FabI (STEWART et al., 1999). No entanto, em altas concentrações, induz o extravasamento de K⁺ levando à lise celular por efeitos no RNA e na síntese de proteínas (YUEH; TUKEY, 2016). Há controvérsias e vários estudos que discutem a segurança no uso do Triclosan em termos de toxicidade a humanos e ao meio

ambiente. Em 2016, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA proibiu o uso de anti-sépticos contendo Triclosan (WEATHERLY; GOSSE, 2017). Na Europa, o Triclosan foi aprovado para uso em cosméticos pela European Community Cosmetic Directive em 1986. No entanto, a Comissão Europeia desaprovou seu uso para fins higiênicos em 2017, mas manteve sua legalidade como conservante em cosméticos selecionados e enxaguatórios bucais em concentrações de até 0,3% e 0,2%, respectivamente

(http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_054.pdf; <http://eur-lex.europa.eu/legal->

[contet/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2014?107:FULL&from=EN](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2014?107:FULL&from=EN)). No Brasil, a concentração de até 0,3% também é permitida pela ANVISA. Visto que a solução utilizada no presente estudo é para imersão e foi formulada com concentração de 0,15%, entende-se que está dentro do recomendado e pode ser uma alternativa ao hipoclorito para casos alérgicos e uso de prótese total em associação com prótese parcial removível.

Com relação ao efeito da escovação com imersão em água sobre a redução de carga microbiana de *C. albicans* e *C. glabrata* ter sido igual à imersão em Triclosan à 0,15% para o adesivo Ultra Corega Creme, pode ser atribuído ao procedimento mecânico da escovação, capaz de desorganizar o biofilme e remover o adesivo (PARANHOS et al., 2007). Entretanto, esta hipótese precisa ser melhor avaliada por meio de estudo que compare a remoção dos dois adesivos da superfície da resina. Contra *S. aureus* e *S. mutans*, os protocolos associando agentes químicos foram mais efetivos que somente a escovação, o que poderia ser explicado em função da adesão dos micro-organismos à superfície da resina.

5.3 Atividade Metabólica

Estudos com o objetivo de avaliar os efeitos de protocolos de higienização sobre o metabolismo celular no biofilme formado sobre adesivos de prótese são escassos. Ao nosso conhecimento, apenas Almeida et al., (2017) analisaram atividade metabólica, do biofilme e observaram que a adição de *Equisetum giganteum* e *Punica granatum* ao adesivo reduziram a atividade metabólica do biofilme se comparada ao adesivo sem as incorporações. Porém, trata-se de um estudo com desenho experimental muito diferente desse.

No presente estudo, o metabolismo celular foi avaliado como o percentual de redução do sal de tetrazólio (XTT) pelos micro-organismos do biofilme formado sobre os adesivos, no grupo sem higienização (GCsh), bem como após exposição aos protocolos (G1, G2 e G3), tendo como padrão o metabolismo celular encontrado no grupo onde o biofilme foi formado sobre a superfície da resina (GCr), sem adesivo. O ensaio de XTT é um método semi-quantitativo que mensura, por espectrocolorimetria, a atividade mitocondrial de células metabolicamente ativas capazes de reduzir o sal de tetrazólio em formazan, alterando a cor da suspensão de trabalho (ROEHM et al., 1991; DA SILVA et al., 2008). Os resultados sobre atividade metabólica obtidos convergem com os resultados sobre a carga microbiana após a higienização do presente estudo.

A escovação associada à imersão em hipoclorito de sódio a 0,25% inibiu completamente o metabolismo celular, estando de acordo com a literatura. Badaró et al., (2021) avaliaram o metabolismo celular do biofilme de próteses totais, sem adesivo, por XTT, e verificaram que a escovação e imersão das próteses em hipoclorito de sódio 0,25% foi capaz de reduzir a zero o metabolismo celular de *Candida ssp.* Pellizzaro et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes, porém com o hipoclorito de sódio a 1%. Os protocolos de escovação com imersão em Triclosan 0,15% ou água causaram diminuição significativa da atividade metabólica (99,74% e 99,22%, respectivamente), entretanto não é possível confrontá-los com a literatura devido à escassez de estudos. Cabe salientar que no sem higienização, houve redução de 8,36% do metabolismo, indicando que os adesivos proporcionam um leve desequilíbrio na atividade metabólica dos micro-organismos, sem, provavelmente, interferir na viabilidade dos mesmos.

5.4 Força adesiva

A retenção de uma prótese total é definida como a resistência que a mesma apresenta ao movimento de tração vertical, em direção contrária à sua inserção, e a estabilidade é definida como a resistência ao deslocamento horizontal. Estas características dependem da quantidade e qualidade de saliva, agente responsável pela adesão entre a superfície da resina acrílica e a mucosa (JACOBSON; KROL, 1983a; 1983b). Além disso, devido ao padrão de reabsorção óssea do rebordo alveolar residual mandibular, a retenção das próteses totais convencionais pode ficar aquém das expectativas do paciente e impactar no desempenho de suas funções

mastigatórias, conforto, segurança e conseqüentemente, na qualidade de vida (CARLSSON, 1998; REGIS et al., 2013). Em situações onde as condições anatômicas não favorecem o atendimento das expectativas dos pacientes, mesmo quando todos os princípios que regem a confecção de uma boa prótese total são seguidos, e após um período de treinamento e tentativa de uso da prótese pelo paciente, a indicação de adesivos pode ser realizada com o objetivo de melhorar a retenção (GRASSO, 2004, PAPADIOCHOU et al., 2015), e portanto, a força de adesão proporcionada por ele é uma das características mais importantes, uma vez que está diretamente relacionada à satisfação do paciente (OKASAKI et al., 2019).

Neste estudo, a fim de simular uma condição próximo ao que ocorre na cavidade bucal, o ensaio de adesão foi realizado com a interposição de um tecido de revestimento fino (pele), proveniente de suíno (FALLAHI et al., 2018), e saliva artificial entre as superfícies de resina acrílica. Foram testados os tempos de adesão inicial, 5 minutos e 4 horas após a aplicação dos adesivos com o objetivo de avaliar em quanto tempo uma força máxima seria alcançada, característica importante para o conforto do paciente. Embora os fabricantes do Ultra Corega Creme e do OlivaFix® Gold garantam um período de fixação de 12 e 24 horas, respectivamente, o tempo de 4 horas foi considerado no presente estudo devido a importância da remoção da prótese para higiene após as refeições (BADARÓ et al., 2020; ARAÚJO et al., 2021).

Os resultados indicaram que no tempo inicial, a força de adesão do adesivo Ultra Corega Creme foi maior que a do OlivaFix® Gold, porém após 5 minutos a força de adesão encontrada com o OlivaFix® Gold foi significativamente maior que a do Ultra Corega Creme mantendo-se constante até 4 horas. Para o Corega, a força máxima foi atingida em 4 horas. E este resultado ao Corega Ultra, o comportamento da força adesiva corroboram com Costa et al. (2021), que observaram uma força adesiva progressiva entre 5 minutos e 3 horas, embora tenham verificado queda dos valores após este período. Comparando os valores da força adesiva deste estudo com os de Costa et al. (2021), verifica-se que há uma diferença entre eles, sendo que os valores obtidos por Costa foram maiores. Avaliando as metodologias, sugere-se que a presença do tecido de revestimento interposto entre os corpos de prova em resina e o fato do adesivo ter sido aplicado com a superfície de resina seca, com aplicação de saliva apenas no tecido, seguindo as orientações dos fabricantes, podem ser fatores responsáveis pelas diferenças entre os valores. Com relação ao

OlivaFix® Gold a comparação dos resultados com outros estudos é limitada devido à escassez de literatura com este material.

A diferença entre os dois materiais analisados poderia ser explicada pela diferença na composição. Os adesivos são compostos por uma mistura de sais de polímero com diferentes graus de solubilidade em água, com o objetivo de obter um produto com ações de curto e longo prazo. A carboximetilcelulose (CMC) e Poli (metil vinil éter/ácido maleico) (PVM-MA) são exemplos de sais de ação curta e longa duração, respectivamente. Esses dois compostos têm diferentes níveis de solubilidade que afetam seu processo de ativação inicial. O composto CMC fornece uma forte retenção inicial, mas devido ao seu alto nível de solubilidade, ele perde sua eficácia em um período relativamente curto. Há também os ingredientes não ativos como derivados de petróleo, óleo mineral e óxido de polietileno como materiais de ligação para facilitar a colocação; óleos de hortelã-pimenta e mentol para aromatizar; tintura para cor; e borato de sódio e metil ou poli-parabeno como conservantes. O volume dos ingredientes ativos e não ativos pode variar entre os produtos (GRASSO, 2004). O Ultra Corega Creme apresenta Poli (metil vinil éter / anidrido maleico) e carboximetilcelulose, enquanto o OlivaFix® Gold tem como seu principal agente de adesão o Poli (vinil-metil-metacrilato). Em proporções diferentes, estes agentes ativos podem causar resultados de força adesiva diferentes.

Ainda, Okazaki et al. (2019) relataram que a espessura do adesivo pode interferir na força adesiva e por isso usou espessuras entre 0,1 e 0,5 mm baseado em um estudo de Miyata (1976) que relata que que esses valores foram observados para próteses bem e mal ajustadas, respectivamente. Porém, o estudo trata de próteses parciais removíveis. A quantidade empregada no presente estudo foi padronizada em 0,5 gramas de adesivos, considerada necessária para cobertura da superfície do corpo de prova, e após a força de compressão aplicada, isso resultou em uma espessura de aproximadamente 0,3 mm, o que provavelmente não interferiu nos resultados. Hsu et al., (2020) avaliaram a adaptação das bases protéticas obtidas por diferentes métodos e verificaram que, na região mediana e posterior do palato, os valores variaram entre 0,53 - 2,21 mm.

Uma limitação desse estudo foi a ausência de um ensaio de remoção dos adesivos de forma a complementar os resultados obtidos, havendo a necessidade de estudos futuros com esta variável. Porém, pode-se afirmar que, frente aos adesivos estudados, os resultados obtidos podem auxiliar a tomada de decisão clínica frente à indicação do melhor adesivo quanto à força adesiva e quanto ao método de higiene a ser utilizado com cada material.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Concluímos que, o uso dos adesivos favoreceu o acúmulo de biofilme e a escovação com imersão em hipoclorito de sódio a 0,25%, foi mais efetivo na redução da carga microbiana e no metabolismo celular, seguido da escovação e imersão em Triclosan a 0,15%. A força de adesão foi maior e mais estável no adesivo OlivaFix® Gold.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Allen PF. Association between diet, social resources and oral health related quality of life in edentulous patients. *J Oral Rehabil.* 2005 Sep;32(9):623-8.
2. Almeida NLM, Saldanha LL, da Silva RA, Pinke KH, da Costa EF, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. Antimicrobial activity of denture adhesive associated with *Equisetum giganteum*- and *Punica granatum*-enriched fractions against *Candida albicans* biofilms on acrylic resin surfaces. *Biofouling.* 2018 Jan;34(1):62-73.
3. Alves AC, Cavalcanti RV, Calderon PS, Pernambuco L, Alchieri JC. Quality of life related to complete denture. *Acta Odontol Latinoam.* 2018 Aug;31(2):91-96.
4. Araújo CB, Ribeiro AB, Fortes CV, Bueno FL, De Wever B, Oliveira VC, Macedo AP, Paranhos HFO, da Silva CHL. Effect of local hygiene protocols on denture-related stomatitis, biofilm, microbial load, and odor: A randomized controlled trial. *J Prosthet Dent.* 2021 Mar 15:S0022-3913(20)30808-8.
5. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987 May;14(3):217-27.
6. Arruda CNF, Salles MM, Badaró MM, de Cássia Oliveira V, Macedo AP, Silva-Lovato CH, de Freitas Oliveira Paranhos H. Effect of sodium hypochlorite and *Ricinus communis* solutions on control of denture biofilm: A randomized crossover clinical trial. *J Prosthet Dent.* 2017 Jun;117(6):729-734.
7. Assunção WG, Zardo GG, Delben JA, Barão VA. Comparing the efficacy of mandibular implant-retained overdentures and conventional dentures among elderly edentulous patients: satisfaction and quality of life. *Gerodontology.* 2007 Dec;24(4):235-8.
8. Atassi M, Milleman KR, Burnett GR, Sanyal S, Milleman JL. A randomized clinical study to evaluate the effect of denture adhesive application technique on food particle accumulation under dentures. *Clin Exp Dent Res.* 2019 Jun 17;5(4):316-325.
9. Azevedo L, Correia A, Almeida CF, Molinero-Mourelle P, Correia M, Del Río Highsmith J. Biocompatibility and Effectiveness of a Novel, Organic Olive Oil-Based Denture Adhesive: A Multicenter Randomized and Placebo-Controlled Clinical Trial. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Mar 25;18(7):3398.
10. Badaró MM, Bueno FL, Arnez RM, Oliveira VC, Macedo AP, de Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. The effects of three disinfection protocols on *Candida* spp., denture stomatitis, and biofilm: A parallel group randomized controlled trial. *J Prosthet Dent.* 2020 Dec;124(6):690-698.
11. Badaró MM, Bueno FL, Makrakis LR, Araújo CB, Oliveira VC, Macedo AP, Paranhos HFO, Watanabe E, Silva-Lovato CH. Action of disinfectant solutions on adaptive capacity and virulence factors of the *Candida* spp. biofilms formed on acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 2021 Sep 3;29:e20210024.

12. Badaró MM, Leite-Fernandes VMF, Martin LT, Oliveira VC, Watanabe E, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. Antibiofilm Activity of an Experimental Ricinus Communis Dentifrice on Soft Denture Liners. *Braz Dent J*. 2019 Jun;30(3):252-258.
13. Badaró MM, Prates TP, Leite-Fernandes VMF, Oliveira VC, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. In Vitro Evaluation of Resilient Liner after Brushing with Conventional and Experimental Ricinus communis-Based Dentifrices. *J Prosthodont*. 2019 Feb;28(2):e857-e862.
14. Badaró MM, Salles MM, de Arruda CNF, Oliveira VC, de Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. In Vitro Analysis of Surface Roughness of Acrylic Resin Exposed to the Combined Hygiene Method of Brushing and Immersion in *Ricinus communis* and Sodium Hypochlorite. *J Prosthodont*. 2017 Aug;26(6):516-521.
15. Badaró MM, Salles MM, Leite VMF, Arruda CNF, Oliveira VC, Nascimento CD, Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. Clinical trial for evaluation of Ricinus communis and sodium hypochlorite as denture cleanser. *J Appl Oral Sci*. 2017 May-Jun;25(3):324-334.
16. Barnabé W, de Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*. 2004 May;31(5):453-9.
17. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*. 1999 Aug;51(8):971-4.
18. Brasil. Ministério Da Saúde - Divisão Nacional De Saúde Bucal. Projeto Sb Brasil: Condições de Saúde Bucal da População Brasileira 2002-2003 Resultados Principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, n. 33, 2000.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Departamento de Monitoramento e Avaliação do SUS. Planejamento Estratégico do Ministério da Saúde : 2011-2015 : resultados e perspectivas / Ministério da Saúde, Secretaria-Executiva, Departamento de Monitoramento e Avaliação do SUS. – 5. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2015.
21. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário estatístico do Brasil IBGE. v 1 1908:1912- Rio de Janeiro : IBGE, 1916-2014.
22. Cardoso M, Balducci I, Telles D de M, Lourenço EJV, Nogueira Júnior L. Edentulismo no Brasil: Tendências, projeções e expectativas até 2040. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2016 Apr 1;21(4):1239-46.

23. Carlsson GE. Clinical morbidity and sequelae of treatment with complete dentures. *J Prosthet Dent.* 1998 Jan;79(1):17-23.
24. Cartagena AF, Esmerino LA, Polak-Junior R, Olivieri Parreiras S, Domingos Michél M, Farago PV, Campanha NH. New denture adhesive containing miconazole nitrate polymeric microparticles: Antifungal, adhesive force and toxicity properties. *Dent Mater.* 2017 Feb;33(2):e53-e61.
25. Chaieb K, Eddouzi J, Souiden Y, Bakhrouf A, Mahdouani K. Biofilm formation and virulence properties of *Candida* spp. isolated from hospitalised patients in Tunisia. *Annals of Microbiology.* 2010 Sep;60(3):481–8.
26. Chen F, Mao T, Cheng X. pH and effects on *Streptococcus mutans* growth of denture adhesives: an in vitro study. *Gerodontology.* 2014 Jun;31(2):95-100.
27. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Oct;23(5):377-83.
28. Costa MS, Lovato da Silva CH, de Cássia Oliveira V, Watanabe E, Dos Reis A, Lepri CP, de Castro DT. Effects of Different Forms of Denture Adhesives on Biofilm Formation, Adhesive Strength and Hygiene of Complete Dentures. *Int J Prosthodont.* 2021 Mar 18.
29. Da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J.* 2008;19(4):364-9.
30. Darwish M, Nassani MZ. Evaluation of the effect of denture adhesives on surface roughness of two chemically different denture base resins. *Eur J Dent.* 2016 Jul-Sep;10(3):321-326.
31. de Oliveira Junior NM, Mendoza Marin DO, Leite ARP, Pero AC, Klein MI, Compagnoni MA. Influence of the use of complete denture adhesives on microbial adhesion and biofilm formation by single- and mixed-species. *PLoS One.* 2018 Oct 10;13(10):e0203951.
32. de Souza RF, Ribeiro AB, Della Vecchia MP, Costa L, Cunha TR, Reis AC, Albuquerque RF Jr. Mini vs. Standard Implants for Mandibular Overdentures: A Randomized Trial. *J Dent Res.* 2015 Oct;94(10):1376-84.
33. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.
34. Fallahi A, Khadivi N, Roohpour N, Middleton AM, Kazemzadeh-Narbat M, Annabi N, Khademhosseini A, Tamayol A. Characterization, mechanistic analysis and improving the properties of denture adhesives. *Dent Mater.* 2018 Jan;34(1):120-131.

35. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev. 1999 Jan;12(1):80-96.
36. Gleiznys A, Zdanavičienė E, Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. Stomatologija. 2015;17(2):54-66.
37. Grasso JE. Denture adhesives. Dent Clin North Am. 2004 Jul;48(3):721-33.
38. Grasso JE. Denture adhesives: changing attitudes. J Am Dent Assoc. 1996 Jan;127(1):90-6.
39. Guo L, Gong S, Wang Y, Sun Q, Duo K, Fei P. Antibacterial Activity of Olive Oil Polyphenol Extract Against *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*: Possible Mechanisms. Foodborne Pathog Dis. 2020 Jun;17(6):396-403.
40. Guo L, Sun Q, Gong S, Bi X, Jiang W, Xue W, Fei P. Antimicrobial Activity and Action Approach of the Olive Oil Polyphenol Extract Against *Listeria monocytogenes*. Front Microbiol. 2019 Jul 23;10:1586.
41. Harada-Hada K, Hong G, Abekura H, Murata H. Evaluation of the efficiency of denture cleaners for removing denture adhesives. Gerodontology. 2016 Dec;33(4):453-460.
42. Harada-Hada K, Mimura S, Hong G, Hashida T, Abekura H, Murata H, Nishimura M, Nikawa H. Accelerating effects of cellulase in the removal of denture adhesives from acrylic denture bases. J Prosthodont Res. 2017 Apr;61(2):185-192.
43. Hazen KC, Plotkin BJ, Klimas DM. Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Infect Immun. 1986 Oct;54(1):269-71.
44. Hedera P, Fink JK, Bockenstedt PL, Brewer GJ. Myelopolyneuropathy and pancytopenia due to copper deficiency and high zinc levels of unknown origin: further support for existence of a new zinc overload syndrome. Arch Neurol. 2003 Sep;60(9):1303-6.
45. Hsu CY, Yang TC, Wang TM, Lin LD. Effects of fabrication techniques on denture base adaptation: An in vitro study. J Prosthet Dent. 2020 Dec;124(6):740-747.
46. Jacobson TE, Krol AJ. A contemporary review of the factors involved in complete dentures. Part III: support. J Prosthet Dent. 1983 Mar;49(3):306-13.
47. Jacobson TE, Krol AJ. A contemporary review of the factors involved in complete denture retention, stability, and support. Part I: retention. J Prosthet Dent. 1983 Jan;49(1):5-15.

48. Kabawat M, de Souza RF, Badaró MM, de Koninck L, Barbeau J, Rompré P, Emami E. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont*. 2014 Jul-Aug;27(4):311-9.
49. Khalatbary AR. Olive oil phenols and neuroprotection. *Nutr Neurosci*. 2013 Nov;16(6):243-9.
50. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun*. 1985 Oct;50(1):97-101.
51. Köhler AT, Rodloff AC, Labahn M, Reinhardt M, Truyen U, Speck S. Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *J Hosp Infect*. 2018 Nov;100(3):e40-e46.
52. Koronis S, Pizatos E, Polyzois G, Lagouvardos P. Clinical evaluation of three denture cushion adhesives by complete denture wearers. *Gerodontology*. 2012 Jun;29(2):e161-9.
53. Laughlin GA, Eick JD, Glaros AG, Young L, Moore DJ. A comparison of palatal adaptation in acrylic resin denture bases using conventional and anchored polymerization techniques. *J Prosthodont*. 2001 Dec;10(4):204-11.
54. Leite AR, Mendoza-Marin DO, Paleari AG, Rodriguez LS, Rocchia AA, Policastro VB, Compagnoni MA, de Souza RF, Pero AC. Crossover clinical trial of the influence of the use of adhesive on biofilm formation. *J Prosthet Dent*. 2014 Aug;112(2):349-56.
55. Leite VM, Pinheiro JB, Pisani MX, Watanabe E, de Souza RF, Paranhos Hde F, Lovato-Silva CH. In vitro antimicrobial activity of an experimental dentifrice based on *Ricinus communis*. *Braz Dent J*. 2014;25(3):191-6.
56. Leoney A, Karthigeyan S, Asharaf AS, Felix AJW. Detection and Categorization of Biofilm-forming *Staphylococcus aureus*, *Viridans streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolated from Complete Denture Patients and Visualization Using Scanning Electron Microscopy. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2020 Sep 28;10(5):627-633.
57. Li Q, Liu J, Shao J, Da W, Shi G, Wang T, Wu D, Wang C. Decreasing Cell Population of Individual *Candida* Species Does Not Impair the Virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Mixed Biofilms. *Front Microbiol*. 2019 Jul 11;10:1600.
58. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Oct;20(10):981-90.
59. Makihira S, Nikawa H, Satonobu SV, Jin C, Hamada T. Growth of *Candida* species on commercial denture adhesives in vitro. *Int J Prosthodont*. 2001 Jan-Feb;14(1):48-52.

60. Marin DO, Leite AR, Paleari AG, Rodriguez LS, Oliveira Junior NM, Pero AC, Compagnoni MA. Effect of a denture adhesive on the satisfaction and kinesiographic parameters of complete denture wearers: a cross-over randomized clinical trial. *Braz Dent J*. 2014 Sep-Oct;25(5):391-8.
61. Marques DM, Oliveira VC, Souza MT, Zanotto ED, Issa JPM, Watanabe E. Biomaterials for orthopedics: anti-biofilm activity of a new bioactive glass coating on titanium implants. *Biofouling*. 2020 Feb;36(2):234-244.
62. Monzillo V, Lallitto F, Russo A, Poggio C, Scribante A, Arciola CR, Bertuccio FR, Colombo M. Ozonized Gel Against Four *Candida* Species: A Pilot Study and Clinical Perspectives. *Materials (Basel)*. 2020 Apr 8;13(7):1731.
63. Monzillo V, Lallitto F, Russo A, Poggio C, Scribante A, Arciola CR, Bertuccio FR, Colombo M. Ozonized Gel Against Four *Candida* Species: A Pilot Study and Clinical Perspectives. *Materials (Basel)*. 2020 Apr 8;13(7):1731.
64. Monzillo V, Lallitto F, Russo A, Poggio C, Scribante A, Arciola CR, Bertuccio FR, Colombo M. Ozonized Gel Against Four *Candida* Species: A Pilot Study and Clinical Perspectives. *Materials (Basel)*. 2020 Apr 8;13(7):1731.
65. Mousa MA, Lynch E, Kielbassa AM. Denture-related stomatitis in new complete denture wearers and its association with *Candida* species colonization: a prospective case-series. *Quintessence Int*. 2020;51(7):554-565.
66. Müller F, Nitschke I. Mundgesundheits, Zahnstatus und Ernährung im Alter [Oral health, dental state and nutrition in older adults]. *Z Gerontol Geriatr*. 2005 Oct;38(5):334-41. German.
67. Mundt T, Polzer I, Samietz S, Grabe HJ, Messerschmidt H, Dören M, Schwarz S, Kocher T, Biffar R, Schwahn C. Socioeconomic indicators and prosthetic replacement of missing teeth in a working-age population--results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Community Dent Oral Epidemiol*. 2009 Apr;37(2):104-15.
68. Mundt T, Schwahn C, Stark T, Biffar R. Clinical response of edentulous people treated with mini dental implants in nine dental practices. *Gerodontology*. 2015 Sep;32(3):179-87.
69. Nagaraj E, Kondody R, Kalambettu A, Vinnakota D, Hari J. Changing trends and clinical recommendations of denture adhesive in complete denture: A review. *Journal of Dental Research and Review*. 2021;8(3):228.
70. Nardi GM, Fais S, Casu C, Mazur M, Di Giorgio R, Grassi R, Grassi FR, Orrù G. Mouthwash Based on Ozonated Olive Oil in Caries Prevention: A Preliminary In-Vitro Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Dec 6;17(23):9106.
71. Nations SP, Boyer PJ, Love LA, Burritt MF, Butz JA, Wolfe GI, Hynan LS, Reisch J, Trivedi JR. Denture cream: an unusual source of excess zinc, leading to hypocupremia and neurologic disease. *Neurology*. 2008 Aug 26;71(9):639-43.

72. Nedumgottil BM. Relative presence of *Streptococcus mutans*, *Veillonella atypica*, and *Granulicatella adiacens* in biofilm of complete dentures. J Indian Prosthodont Soc. 2018 Jan-Mar;18(1):24-28.
73. Nedumgottil BM. Relative presence of *Streptococcus mutans*, *Veillonella atypica*, and *Granulicatella adiacens* in biofilm of complete dentures. J Indian Prosthodont Soc. 2018 Jan-Mar;18(1):24-28.
74. Nunes ÉM, Policastro VB, Scavassin PM, Leite AR, Mendoza Marin DO, Giro G, de Oliveira Júnior NM, Compagnoni MA, Pero AC. Crossover clinical trial of different methods of removing a denture adhesive and the influence on the oral microbiota. J Prosthet Dent. 2016 Apr;115(4):462-8.
75. Okazaki H, Yoshida K, Egoshi T, Takase K, Murata H. Influence of composition and powder/water ratio on adhesion strength and initial viscosity of powder-type denture adhesives based on CMC-Na and PVM-MA. Dent Mater J. 2019 Dec 1;38(6):994-1001.
76. Okazaki H, Yoshida K, Egoshi T, Takase K, Murata H. Influence of composition and powder/water ratio on adhesion strength and initial viscosity of powder-type denture adhesives based on CMC-Na and PVM-MA. Dent Mater J. 2019 Dec 1;38(6):994-1001.
77. Oliveira MC, Oliveira VM, Vieira AC, Rambob I. In vivo assessment of the effect of an adhesive for complete dentures on colonisation of *Candida* species. Gerodontology. 2010 Dec;27(4):303-7.
78. Oliveira SGD, Martos J, Carvalho RV, Pereira CMP, Lund RG, Piva E. Retentive efficacy, antimicrobial and cytotoxicity comparisons between different types of commercial and experimental denture adhesives with antifungal action. Dent Mater J. 2021 Jul 31;40(4):1055-1062.
79. Ozkan YK, Uçankale M, Ozcan M, Uner N. Effect of denture adhesive on the micro-organisms in vivo. Gerodontology. 2012 Mar;29(1):9-16.
80. Padilha DM, Hugo FN, Hilgert JB, Dal Moro RG. Hand function and oral hygiene in older institutionalized Brazilians. J Am Geriatr Soc. 2007 Sep;55(9):1333-8.
81. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. Am J Dent. 2016 Jun;29(3):154-60.
82. Papadiochou S, Emmanouil I, Papadiochos I. Denture adhesives: a systematic review. J Prosthet Dent. 2015 May;113(5):391-397.e2.
83. 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 Jul;18(5):427-31.

84. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2007 Aug;34(8):606-12.
85. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003 May;30(5):532-6.
86. 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.
87. Phaechamud T, Chanyaboonsub N, Setthajindalert O. Doxycycline hyclate-loaded bleached shellac in situ forming microparticle for intraperiodontal pocket local delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2016 Oct 10;93:360-70.
88. Pietrocola G, Ceci M, Preda F, Poggio C, Colombo M. Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens. *J Clin Exp Dent.* 2018 Nov 1;10(11):e1103-e1108.
89. Polychronakis N, Sykaras N, Polyzois G, Lagouvardos P. Removal of denture adhesives from PMMA and Polyamide denture base materials. *J Appl Oral Sci.* 2021 Mar 26;29:e20200448.
90. Polyzois G, Stefaniotis T, Papaparaskevas J, Donta C. Antimicrobial efficacy of denture adhesives on some oral malodor-related microbes. *Odontology.* 2013 Jan;101(1):103-7.
91. Ribeiro AB, Della Vecchia MP, Cunha TR, Sorgini DB, Dos Reis AC, Muglia VA, de Albuquerque RF Jr, de Souza RF. Short-term post-operative pain and discomfort following insertion of mini-implants for retaining mandibular overdentures: a randomized controlled trial. *J Oral Rehabil.* 2015 Aug;42(8):605-14.
92. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods.* 1991 Sep 13;142(2):257-65.
93. Saintrain MV, de Souza EH. Impact of tooth loss on the quality of life. *Gerodontology.* 2012 Jun;29(2):e632-6.
94. Salles MM, Badaró MM, Arruda CN, Leite VM, Silva CH, Watanabe E, Oliveira Vde C, Paranhos Hde F. Antimicrobial activity of complete denture cleanser solutions based on sodium hypochlorite and *Ricinus communis* - a randomized clinical study. *J Appl Oral Sci.* 2015 Nov-Dec;23(6):637-42.
95. Sampaio-Maia B, Figueiral MH, Sousa-Rodrigues P, Fernandes MH, Scully C. The effect of denture adhesives on *Candida albicans* growth in vitro. *Gerodontology.* 2012 Jun;29(2):e348-56.

96. Shu X, Fan Y, Lo ECM, Leung KCM. A systematic review and meta-analysis to evaluate the efficacy of denture adhesives. *J Dent*. 2021 May;108:103638.
97. Stewart MJ, Parikh S, Xiao G, Tonge PJ, Kisker C. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by Triclosan. *Journal of molecular biology*, 1999 Nov; 290(4): 859-865.
98. Thielmann J, Kohnen S, Hauser C. Antimicrobial activity of *Olea europaea* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. *Int J Food Microbiol*. 2017 Jun 19;251:48-66.
99. Torres-Sánchez C, Montoya-Salazar V, Torres-Lagares D, Gutierrez-Pérez JL, Jimenez-Castellanos E. Satisfaction in complete denture wearers with and without adhesives: A randomized, crossover, double-blind clinical trial. *J Clin Exp Dent*. 2018 Jun 1;10(6):e585-e590.
100. Walton JN, MacEntee MI. Choosing or refusing oral implants: a prospective study of edentulous volunteers for a clinical trial. *Int J Prosthodont*. 2005 Nov-Dec;18(6):483-8.
101. Weatherly LM, Gosse JA. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2017;20(8):447-469.
102. World Health Organization. (2017). Sugars and dental caries (No. WHO/NMH/NHD/1712). World Health Organization.
103. Yano J, Yu A, Fidel PL Jr, Noverr MC. *Candida glabrata* Has No Enhancing Role in the Pathogenesis of *Candida*-Associated Denture Stomatitis in a Rat Model. *mSphere*. 2019 Apr 3;4(2):e00191-19.
104. Yueh MF, Tukey RH. Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016;56:251-72.
105. Zakrzewski W, Dobrzynski M, Nowicka J, Pajaczkowska M, Szymonowicz M, Targonska S, Sobierajska P, Wiglusz K, Dobrzynski W, Lubojanski A, Fedorowicz S, Rybak Z, Wiglusz RJ. The Influence of Ozonated Olive Oil-Loaded and Copper-Doped Nanohydroxyapatites on Planktonic Forms of Microorganisms. *Nanomaterials (Basel)*. 2020 Oct 10;10(10):1997.
106. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis AS, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont*. 2000 Mar-Apr;13(2):136-40.