



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS DENTÁRIOS E PRÓTESE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
(REABILITAÇÃO ORAL)



ISABELA PEZOTI MORETTO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBIOFILME E DOS EFEITOS DE DENTIFRÍCIOS
EXPERIMENTAIS À BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SUPERFÍCIE METÁLICA
DE LIGA DE COBALTO CROMO**

RIBEIRÃO PRETO

2022

ISABELA PEZOTI MORETTO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBIOFILME E DOS EFEITOS DE DENTIFRÍCIOS
EXPERIMENTAIS À BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SUPERFÍCIE METÁLICA
DE LIGA DE COBALTO CROMO**

VERSÃO ORIGINAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Área de Reabilitação Oral).

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2022

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Moretto, Isabela Pezoti

Avaliação da ação antibiofilme e dos efeitos de dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais na superfície metálica de liga de cobalto cromo / Isabela Pezoti Moretto; Orientadora: Valéria Oliveira Pagnano, Ribeirão Preto, 2022.

153p.: il.; 30cm

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Versão Original

- 1- Óleos essenciais. 2- Dentifrícios. 3- Liga de cobalto cromo. 4- Biofilme. 5- Ação antibiofilme. 6-Rugosidade de superfície. 7-Alteração de brilho.

ISABELA PEZOTI MORETTO

Moretto IP. **Avaliação da ação antibiofilme e dos efeitos de dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais na superfície metálica de liga de cobalto cromo.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza

Aprovado em: ___/___/ 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

À **Deus**, primeiramente, que sempre esteve ao meu lado me guiando nesta trajetória, me protegendo, dando sabedoria, coragem e me ouvindo nos momentos mais difíceis, sendo meu confidente.

À minha mãe **Juliana de Fátima Pezoti Moretto** e ao meu pai **Flávio de Jesus Moretto**, por todo amor e confiança depositados, por sempre investirem em meus sonhos sem medir esforços, sempre me colocando em prioridade e acreditando no meu potencial. Gratidão eterna a vocês.

À minha irmã, **Bruna Helena Moretto**, que em todo momento que precisei de sua ajuda, não mediu esforços para me socorrer. Sempre me motivando e passando seus conhecimentos. Obrigada por todo ensinamento e parceria.

Ao meu namorado, **Airton Paulo Moretto**, que foi meu companheiro nessa jornada, sempre me incentivando e acreditando no meu potencial. Obrigada por todo carinho e amor dispensados a mim durante esse tempo. Meu amor e eterna gratidão a você.

Agradecimento Especial

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza**, por ser o ser humano mais incrível que conheci ao longo dessa jornada, por sempre acreditar em mim, mesmo diante de todos os momentos difíceis que enfrentei neste processo. Agradeço todo apoio, compreensão, carinho e toda preocupação que sempre teve comigo. Sem dúvidas, você fez que essa caminhada se tornasse mais leve e prazerosa. Obrigada por todo aprendizado, conversas e momentos vividos ao longo desses anos. Minha eterna gratidão e admiração pela senhora.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP)**, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Reabilitação Oral do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP**, que se dedica em oferecer o melhor e que muito contribuiu para minha formação.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da FORP-USP**, pelo esforço, incentivo e dedicação aos alunos.

Aos Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP e em especial, **Profa. Dra. Helena Paranhos**, por toda contribuição e ensinamentos para desenvolvimento do meu projeto.

À doutoranda **Andrezza Cristina Moura dos Santos** e mestranda **Fernanda Pompeo**, que me ajudaram tanto para que pudesse executar meu trabalho, pelas conversas, desabafos e todos os momentos de descontração. Guardarei todos esses momentos com muito carinho e gratidão.

Aos meus queridos **colegas** da Pós-Graduação, pelos momentos agradáveis vividos durante as disciplinas, pelos momentos divertidos e inesquecíveis.

Às técnicas de laboratório, **Ana Paula Macedo** e **Viviane de Cássia Oliveira** que não mediram esforços para que o projeto fosse executado. Sempre com tanto empenho e dispostas a explicar tudo nos mínimos detalhes. Vocês foram primordiais para que tudo se concretizasse. Minha admiração pelas profissionais excelentes e capacitadas que são. Agradeço pelas palavras amigas e momentos maravilhosos que podemos conviver neste período.

A todos os **funcionários** do Departamento de Materiais Dentários da FORP-USP, que mantêm a organização e o funcionamento de todos os trabalhos, em especial ao técnico Marcelo Vieira, por toda ajuda e carinho em todos os momentos.

À técnica **Adriana Cláudia Lapria Faria Queiroz** do Laboratório de Estudos Biomecânicos em Prótese e Implantes, pelo apoio técnico e ajuda no desenvolvimento de escovação mecânica e utilização do espectrofotômetro para que este trabalho fosse concluído.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)** pela bolsa fornecida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse executado.

Resumo

RESUMO

Moretto IP. **Avaliação da ação antibiofilme e dos efeitos de dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais na superfície metálica de liga de cobalto cromo.** Ribeirão Preto, 2022. 153p. Dissertação de Mestrado (Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibiofilme e os possíveis efeitos adversos de três dentifrícios à base de óleos essenciais na concentração de 0,5% de *Eucalyptus citriodora* (Ec), *Melaleuca alternifolia* (Ma) e *Pinus strobus* (Ps) na superfície metálica de liga de cobalto-cromo (Co-Cr). Foram obtidos 146 espécimes de Co-Cr circulares (\varnothing 12 mm x 4 mm) a partir de padrões de cera confeccionados por meio de uma matriz de teflon. Após fundição em máquina eletrônica, os espécimes foram polidos. Para avaliação da ação antibiofilme, foram submetidos à esterilização em autoclave, sendo que 77 espécimes foram contaminados com biofilme multiespécie composto por: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* e 9 foram utilizados como controle de esterilidade do experimento. Após a maturação do biofilme, cada poço recebeu 1,5 mL de Brain Heart Infusion Broth inoculado com os microrganismos (leveduras: 10^6 UFC/mL; bactérias: 10^7 UFC/mL) com exceção do grupo controle negativo, o qual recebeu meio de cultura estéril, onde os espécimes foram aleatoriamente distribuídos nos grupos: Controle (sem escovação), Água destilada (Ad), Placebo (P), dentifrício comercial Trihydral™ (T), Ec, Ma e Ps. Permaneceram incubados em microaerofilia a 37 °C sob agitação de 75 rpm por 48 horas, com troca do meio após 24 horas. Foi realizada escovação manual de cada espécime por 20 segundos com escova dental macia (CS 1560 Soft, Curaprox). A determinação do número de microrganismos viáveis (n=9) foi realizada por contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) e a análise da capacidade de remoção do biofilme (n=2) por Microscopia de Fluorescência (MEV). 60 espécimes foram distribuídos nos grupos: Ad; P; T; Ec; Ma; e Ps; e submetidos à escovação em máquina, simulando 5 anos para análises de rugosidade de superfície (ΔRa , μm) e do brilho (ΔGU) (n=10), por rugosímetro e por espectrofotômetro, respectivamente. Foram realizadas três leituras antes e após a escovação para ambas as análises. Os dados foram testados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. A distribuição dos dados foi não normal, tendo sido utilizado nparLD seguido de Friedman-Conover com ajuste Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) para os dados relativos à capacidade de remoção do biofilme e Kruskal-Wallis seguido de Dunn com ajuste de Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) para os dados referentes às outras análises ($\alpha=0,05$). Quanto à contagem de UFC, para *S. aureus*, P, Ec, Ma e Ps foram similares a T ($p<0,001$), Ad propiciou maior contagem que T ($p=0,002$). Para os demais microrganismos, não houve diferença entre os dentifrícios e Ad promoveu menor contagem que C. Ec removeu mais biofilme que P ($p=0,010$), Ma ($p=0,012$) e Ps ($p=0,005$). Não houve alteração da rugosidade e de brilho na superfície de Co-Cr. O óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* pode ser promissor na higienização de próteses parciais removíveis.

Palavras-chave: Óleos essenciais, dentifrícios, liga de cobalto cromo, ação antibiofilme, rugosidade de superfície, alteração de brilho.

Abstract

ABSTRACT

Moretto IP. **Evaluation of the antibiofilm action of dentifrices based on essential oils on the metallic surface of cobalt–chromium alloy.** Ribeirão Preto, 2022. 153f. Dissertation Master's (Oral Rehabilitation) School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

This study aimed to evaluate the antibiofilm action and the possible adverse effects of three dentifrices based on essential oils at a concentration of 0.5% of *Eucalyptus citriodora* (Ec), *Melaleuca alternifolia* (Ma), and *Pinus strobus* (Ps) on the metallic surface of cobalt-chromium alloy (Co–Cr). A total of 146 circular Co–Cr specimens were obtained (\varnothing 12 mm \times 4 mm) from wax patterns made using a teflon matrix. After casting in an electronic machine, the specimens were polished, sterilized by autoclaving, and used to evaluate the antibiofilm action. Seventy-seven specimens were contaminated with a multispecies biofilm composed of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Streptococcus mutans*, and *Staphylococcus aureus*, and 9 were used as sterile controls in the experiment. After biofilm maturation, each well received 1.5 mL of Brain Heart Infusion Broth inoculated with the microorganisms (yeast: 10^6 CFU/mL; bacteria: 10^7 CFU/mL) except for the negative control group, which received sterile culture medium, where the specimens randomly assigned to groups: control (no brushing), distilled water (DW), placebo (P), Trihydral™ commercial dentifrice (T), Ec, Ma, and Ps. They remained incubated microaerophilic 37 °C under 75 rpm agitation for 48 hours, with medium change after 24 hours. Each specimen was manually brushed for 20 s with a soft toothbrush (CS 1560 Soft, Curaprox). The number of viable microorganisms (n=9) was determined by counting colony forming units (CFU/mL) and the biofilm removal capacity (n=2) were analyzed by fluorescence microscopy (MEV). Sixty specimens were distributed in groups (DW; P; T; Ec; Ma; and Ps) for the analysis of adverse effects and brushed using a machine, simulating 5 years. The surface roughness (Δ Ra) and gloss (Δ GU, n=10) were analyzed using a roughness meter and spectrophotometer, respectively. Data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. The data distribution was non-normal, and nparLD followed by Friedman-Conover with Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) adjustment was used for the biofilm removal capacity data and Kruskal-Wallis followed by Dunn with Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) adjustment for the other analyses ($\alpha=0.05$). The CFU counts of *S. aureus*, P, Ec, Ma, and Ps were similar to that of T ($p < 0.001$), while DW showed a higher count than that of T ($p = 0.002$). There was no difference between the dentifrices and DW for the other microorganisms, which had a lower count than the control. Ec removed more biofilm than P ($p = 0.010$), Ma ($p = 0.012$), and Ps ($p = 0.005$). There was no change in roughness and gloss on the Co–Cr surface. The essential oil of *Eucalyptus citriodora* may be promising in sanitizing removable partial dentures.

Keywords: Essential oils, dentifrices, cobalt chromium alloy, antibiofilm action, surface roughness, gloss change.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Matriz de teflon	88
Figura 2 -	Plastificador elétrico	88
Figura 3 -	Cera liquefeita sendo vertida com conta gotas no interior da matriz.....	88
Figura 4 -	Acabamento do disco de cera	88
Figura 5 -	Discos de cera com pequena haste de canais de alimentação.....	89
Figura 6 -	Posicionamento dos discos de cera na base do anel de fundição.....	89
Figura 7 -	Discos de cera posicionados no anel de fundição	89
Figura 8 -	Forno usado para expansão do revestimento e eliminação da cera.....	90
Figura 9 -	Máquina eletrônica por eletroindução a vácuo	91
Figura 10 -	Lingotes de Co-Cr posicionados para fundição	91
Figura 11 -	Espécimes após fundição e separação dos canais de alimentação.....	92
Figura 12 -	Politriz com lixa adaptada	93
Figura 13 -	Espécime metálico após polimento	94
Figura 14 -	Bisnaga com dentifrício	97
Figura 15 -	Centrifuga	98
Figura 16 -	Espectrofotômetro	98
Figura 17 -	Conjunto placa e espécime metálico	100
Figura 18 -	Escovas dentais	101
Figura 19 -	Suspensão de dentifrício	101
Figura 20 -	Colocação do dentifrício sobre o espécime metálico	102
Figura 21 -	Escovação de um espécime metálico	102
Figura 22 -	Microscópio de Fluorescência.....	104
Figura 23 -	Máquina de Escovação	105
Figura 24 -	Escovas dentais com cabos cortados	105
Figura 25 -	Escova com cabo encaixado na sapata	106
Figura 26 -	Escova na máquina.....	106
Figura 27 -	Escovas dentais posicionadas e cubas com suspensão de dentifrício e água destilada.....	107
Figura 28 -	Rugosímetro de superfície	107
Figura 29 -	Leituras realizadas nas regiões correspondentes às demarcações.....	108
Figura 30 -	Espectrofotômetro	109
Figura 31 -	Matriz de acrílico	109
Figura 32 -	Crescimento de <i>S. aureus</i> em meio de cultura Manitol Salt Agar.....	115

Figura 33 -	Crescimento de <i>S. mutans</i> em meio de cultura Mitis Salivarius Agar Base.....	115
Figura 34 -	Crescimento de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> em meio de cultura CHROMagar Candida.....	115
Figura 35 -	Microscopia de fluorescência evidenciando a área coberta por biofilme na superfície de Co-Cr, após ensaio de escovação. A coloração verde indica células vivas. A coloração vermelha indica células mortas.....	118
Figura 36 -	Espécime de Co-Cr após ensaio escovação	119
Figura 37 -	Espécime de Co-Cr após ensaio de escovação	120

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição básica dos dentifrícios.....	95
Tabela 2 -	UFC/mL, em $\log_{10}^{(UFC+1)}$ – Média (desvio padrão) e mediana (intervalo de confiança) relativos aos microrganismos <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	114
Tabela 3 -	Tabela estatística (Teste nparLD) para a capacidade de remoção de biofilme.....	116
Tabela 4 -	Mediana e intervalo de confiança de 95% relativos ao biofilme vivo e biofilme total	117
Tabela 5 -	Média (desvio padrão) e mediana (intervalo de confiança) relativos à rugosidade de superfície (μm)	118
Tabela 6 -	Média (desvio padrão) e mediana (intervalo de confiança) da alteração de brilho (GU)	119

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	39
2. PROPOSIÇÃO	47
2.1. Objetivo geral.....	49
2.2. Objetivos específicos	49
3. REVISÃO DE LITERATURA	51
4. MATERIAL E MÉTODO	85
4.1. Delineamento experimental	87
4.1.1. <i>Avaliação da ação antibiofilme</i>	87
4.1.2. <i>Avaliação dos efeitos adversos</i>	87
4.1.2.1. <i>Rugosidade de superfície e alteração de brilho</i>	87
4.2. Confecção dos Corpos de Prova	88
4.2.1. Inclusão dos padrões de cera.....	89
4.2.2. Fundição dos Discos Metálicos	90
4.2.3. Acabamento e Polimento	92
4.3. Cepas microbianas	94
4.4. Formulação dos dentifrícios	95
4.5. Análise da ação antibiofilme	97
4.5.1. Obtenção do inóculo	97
4.5.2. Contaminação dos espécimes e formação do biofilme	99
4.5.3. Procedimento de Escovação	100
4.5.4. Determinação da quantidade de microrganismos viáveis após escovação	102
4.6. Análise da capacidade de remoção do biofilme	103
4.7. Ensaio de escovação para análise de efeitos adversos	104
4.8. Avaliação da rugosidade de superfície	107
4.9. Avaliação da alteração de brilho	108
4.10. Análise estatística	109
5. RESULTADOS	111
5.1. Análise da ação antibiofilme.....	113
5.2. Análise da capacidade de remoção de biofilme	116
6. DISCUSSÃO	121
7. CONCLUSÃO	133
REFERÊNCIAS	137

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida tem aumentado com o passar dos anos e as pessoas cada vez mais têm preservado seus dentes, levando à redução da população totalmente desdentada (Kapur, 1991; Douglass et al., 2002; Wostmann et al., 2005). Cardoso et al. (2016), apontam que até 2040, os maxilares edêntulos serão praticamente zero entre os adolescentes, 1,77% entre os adultos e 85,96% entre os idosos. Nesse contexto, as Próteses Parciais Removíveis (PPRs) têm sido cada vez mais utilizadas para reabilitação de pacientes parcialmente desdentados, pois, além de preservarem estruturas remanescentes, com pequena necessidade de desgaste da estrutura dentária, suprem todas as funções (mastigatória, estética e fonética), devolvem conforto e saúde ao paciente e são relativamente menos onerosas (Amaral et al., 2010; Carr et al., 2012).

Segundo a literatura, a PPR é uma alternativa interessante como tratamento reabilitador (Rissin et al., 1985; Kapur, 1991; Bergman et al., 1995; Mengatto et al., 2015). No entanto, devido ao fato de ser composta por metal e resina, torna-se mais complexa em relação às próteses totais (PTs) convencionais. Geralmente a estrutura metálica é de liga de cobalto cromo (Co-Cr), sendo suscetível também à adesão de microrganismos, assim como a resina acrílica, o que torna sua higienização mais difícil comparada à da PT (Cakan et al., 2015).

Como é de conhecimento, as próteses dentárias podem servir de reservatório de microrganismos, que atuam como patógenos oportunistas e se associam a doenças sistêmicas e orais (Mengatto et al., 2015), podendo estar relacionados ao aumento de doenças periodontais, mobilidade e cárie dentária, devido ao acúmulo de biofilme nos grampos e dentes pilares (Mullally et al., 1994; Bergman et al., 1995; Pontes et al., 2009; Mengatto et al., 2015). No entanto, o uso de PPRs isoladamente não é a causa principal das patologias orais adicionais, mas sim, em conjunto com o acúmulo de biofilme, devido à falta ou deficiência na higiene bucal (Bergman, 1982; Van, 2009).

O biofilme é constituído por comunidades de microrganismos que se aderem a superfícies dentais e estruturas de próteses, envoltos por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas de seus produtos metabólicos, criando uma estrutura complexa e tridimensional, conhecida como película adquirida (Remage et al., 2004; Marsh, 2010). A partir da colonização de certos microrganismos pioneiros, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, outros podem se agregar por interações específicas, como os da espécie *Candida*, tendo sinergismo entre eles, favorecendo o desenvolvimento do biofilme multiespécies (Drake et al., 1992; Shay, 2000; Takahashi et al., 2011; Valentini et al., 2013; Wade, 2013; Allison et al., 2016). Portanto, a avaliação desses microrganismos em conjunto é de grande importância.

A Estomatite relacionada à prótese (ERP) é uma patologia que comumente acomete usuários de prótese, associada frequentemente à ação de *Candida albicans*, mas também de *Candida glabrata*, manifestada como inflamação da mucosa oral, podendo não apresentar sintomatologia alguma ou forte ardência; com pequeno desconforto ou dor severa (Mizugai et al., 2007; Coco et al., 2008; Sesma et al., 2011).

Diferentes métodos de remoção do biofilme são utilizados para higienizar as próteses, sendo mais comumente usados os métodos mecânicos (Freitas et al., 2006; Pontes et al., 2009; Gonçalves et al., 2011, Axe et al., 2016, Papadiochou et al., 2017), imersão em agentes químicos (Paranhos et al., 2013; Vasconcelos et al., 2019; Curylofo et al., 2020; Vasconcelos et al., 2020) ou a associação de ambos os métodos (Nikawa et al., 1999; Shay, 2000; Papadiochou et al., 2018).

A técnica mais utilizada para higienização de próteses baseia-se na remoção mecânica de detritos, com escova dental e dentífrício (Purnaveja et al., 1982; Haselden et al., 1998; Dyer et al., 2001; Freitas et al., 2006; Pontes et al., 2009; Papadiochou et al., 2018). Embora tenha a vantagem de ser um método simples, eficaz e de baixo custo (Purnaveja et al., 1982; Freitas et al., 2006; Pontes et al., 2009; Papadiochou et al., 2018), a sua maior desvantagem é apresentar ação abrasiva sobre os materiais que compõem a prótese (Freitas et al., 2006; Pontes et al., 2009; Papadiochou et al., 2018; Chang et al., 2021), devido à associação com dentífrícios que apresentam em sua composição agentes abrasivos, como sílica e carbonato de cálcio (Freitas et al., 2006; Pontes et al., 2009). A abrasão pela escovação acarreta perda de brilho da superfície, aumento da rugosidade, perda de massa, irregularidades na superfície das estruturas da prótese, propiciando maior

acúmulo de biofilme (Bollen et al., 1997; Freitas et al., 2006; Pontes et al., 2009; Ramage et al., 2019).

Como métodos químicos existem vários produtos de higienização: hipocloritos, peróxidos, enzimas, ácidos, drogas brutas e enxaguatórios bucais, utilizados em diferentes estudos (Nikawa et al., 1999; Paranhos et al., 2019; Ribeiro Rocha et al., 2020; Arruda et al., 2021; Bae et al., 2021; Curylofo et al., 2021; Coimbra et al., 2021; Rocha et al., 2021). Comumente utilizado, o hipoclorito de sódio, se mostra prejudicial às ligas de Co-Cr (Budtz-Jørgensen, 1979; Keyf, Gungor, 2003; Felipucci et al., 2011b; Paranhos et al., 2014; Kiesow et al., 2016). Os peróxidos são comercialmente conhecidos como pastilhas efervescentes, se tornando uma alternativa ao hipoclorito de sódio. Mas, em algumas marcas comerciais estão presentes o cloro ou o oxigênio, que podem causar efeitos adversos sobre a estrutura metálica da PPR (Abere, 1979; Paranhos et al., 2014). Entretanto, trabalhos avaliaram que pastilhas efervescentes de peróxidos alcalino são amplamente utilizados e comprovam que não causam efeitos deletérios na superfície da liga metálica de Co-Cr (Vasconcelos et al., 2019). Estudos comprovam a eficácia quanto à remoção de biofilme e diminuição do número das unidades formadoras de colônias (UFC) em bases de próteses de resina acrílica (Budtz-Jørgensen, 1979; Silva-Lovato et al., 2010; Andrade et al., 2011; Coimbra et al., 2016; Paranhos et al., 2019) e na estrutura metálica (Taylor et al., 1998; Curylofo et al., 2021).

Devido ao método mecânico ser o mais utilizado, no mercado há grande variedade de dentifrícios com as mais diferentes formulações (Panzeri et al., 2009; Magalhães et al., 2011). Os dentifrícios são constituídos basicamente por: agentes ativos (terapêuticos), agentes abrasivos, detergentes, pigmentos, espessantes, umectantes e aromatizantes (Panzeri et al., 2009; Sorgini et al., 2012). Outras substâncias também podem ser encontradas, como agentes clareadores, substâncias antimicrobianas, surfactantes, sendo esses dois últimos incorporados para remoção mais eficaz de biofilme (Panzeri et al., 2009; Sorgini et al., 2012). Para ser um método de higiene eficaz, além de deve apresentar ação bactericida e fungicida, as características físicas e mecânicas da prótese devem ser preservadas (Porta et al., 2015).

Alguns estudos avaliaram os efeitos que escovas dentais provocam na superfície metálica da prótese associadas a diferentes dentifrícios, por meio da

análise da rugosidade de superfície (Acharya et al., 2014), corrosão (Melo et al., 1985), abrasividade (Molina et al., 2008; Nogués et al., 2008; Pisani et al., 2010) e liberação de íons (Wataha et al., 2002), podendo causar danos biológicos, funcionais e interferir na aparência estética das próteses.

Devido ao efeito adverso que a escova associada a dentífrícios comercializados pode causar às superfícies das próteses, pesquisas com dentífrícios a base de óleos essenciais têm sido feitas (Badaró et al., 2019a; Santos et al., 2021). Apesar de produtos naturais já serem bastante utilizados em dentífrícios convencionais (Shaheen et al., 2015; Carvalho et al., 2020; Casarin et al., 2017; Varma et al., 2018), a utilização em dentífrícios para higienização de próteses ainda não é muito divulgada. Na busca por dentífrícios naturais através de produtos fitoterápicos que promovessem benefícios químicos e físicos, foi possível encontrar formulações que apresentassem ação antimicrobiana, antibiofilme e anti-inflamatória (Smolarek et al., 2015; Varma et al., 2018; Carvalho et al., 2020; Santos et al., 2021). Assim, devido a este potencial antimicrobiano, o uso de dentífrícios com produtos naturais se torna valioso recurso no controle do biofilme em pacientes que fazem uso de próteses e auxiliam na manutenção da saúde bucal.

A atividade antimicrobiana tem sido demonstrada pelos óleos de *Bowdichia virgilioides* Kunth, *Copaifera officinalis*, *Curcuma longa*, *Eucalyptus citriodora*, *Melaleuca alternifolia*, *Pinus strobus* e *Ricinus communis*, podendo serem utilizados como princípios ativos (Mordenti et al., 1982, Baranowska et al., 2002, Carson et al., 2006, Moghadamtousi et al., 2014, Diefenbach et al., 2016).

Para as superfícies metálicas, diferentemente das superfícies em resina acrílica termopolimerizável, ainda não existe um método totalmente seguro e eficaz para sua higienização (Curylofo et al., 2018), apesar de novos métodos, como a terapia fotodinâmica e derivado de porfirina, estarem sendo estudados (AlHamdan et al., 2021). A higienização da PPR deve buscar longevidade do tratamento e manutenção da saúde bucal (Vasconcelos et al., 2019, Curylofo et al., 2020). Desta forma é necessária a investigação de novas formulações de dentífrícios para higienização de PPRs com eficiente ação antimicrobiana e sem danos significativos às estruturas da prótese, que sejam acessíveis a toda a população.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é bom antisséptico, atuando no controle do biofilme dental, além de apresentar grande potencial terapêutico em processos inflamatórios, característicos da gengivite e periodontite crônica

(Soukoulis et al., 2004). Possuem ação antimicrobiana frente a biofilmes de *Candida albicans* (Ramage et al., 2012).

O Eucalipto, tem como destaque a espécie vegetal *E. citriodora*, apresentando atividade antifúngica para uso farmacêutico (Ramenazi et al., 2002). Tem conforme suas diferentes espécies, óleos com aplicações para reflorestamento (FAO, 2001) e com finalidades comerciais (indústrias farmacêuticas e cosméticas) (Brooker & Kleinig, 2004; Batish et al., 2006). Akin-Osanaiye et al., 2007 avaliaram e comprovaram a atividade antimicrobiana deste óleo frente a *Staphylococcus aureus*. Apesar de estudos comprovarem a ação antibacteriana do óleo essencial de eucalipto, contra *P. gingivalis* (Hans et al., 2016), a literatura ainda evidencia que existem lacunas em relação a real efetividade do óleo essencial de eucalipto. Sendo assim, são necessários mais estudos com espécies diferentes de eucalipto para definir mais precisamente os efeitos antimicrobianos dessa substância (Dhakad et al., 2017).

O óleo essencial *Pinus strobus*, conhecido como Pinheiro Branco, é apontado seu potencial antifúngico (Cox et al., 2000; Cox et al., 2001). De acordo com autores, é um óleo com propriedades antissépticas, antivirais, antibióticas, anti-inflamatórias e antirreumáticas (Kim et al., 2005; Lee et al., 2008; Abi-Ayad et al., 2011). No entanto, há poucos estudos científicos que comprovem as propriedades citadas desse óleo.

Assim, baseado no estudo de Santos et al. (2021), que concluíram que os dentifrícios à base de óleos essenciais na concentração de 0,5 % de *E. citriodora*, *M. alternifolia* e *P. strobus* apresentaram os melhores resultados em relação às características organolépticas, propriedades físico-químicas, ação antimicrobiana e antibiofilme sobre espécimes de resina acrílica, este estudo visou avaliar os efeitos adversos e a ação antibiofilme destes dentifrícios sobre a superfície metálica de Co-Cr.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar, por meio de ensaio *in vitro*, a ação antibiofilme e os possíveis efeitos adversos de três dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais (*Eucalyptus citriodora*, *Melaleuca alternifolia* e *Pinus strobus*) sobre a superfície metálica de Co-Cr.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a ação antibiofilme de três dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais (*E. citriodora*, *M. alternifolia* e *P. strobus*) em relação a *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. mutans* e *S. aureus* em um modelo de biofilme multiespécie, presente na superfície metálica de Co-Cr, por meio de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC);
2. Avaliar a ação antibiofilme de três dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais (*E. citriodora*, *M. alternifolia* e *P. strobus*) em relação a *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. mutans* e *S. aureus* em um modelo de biofilme multiespécie, presente na superfície metálica de Co-Cr, pela análise da capacidade de remoção do biofilme por Microscopia de Fluorescência;
3. Avaliar o efeito de três dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais (*E. citriodora*, *M. alternifolia* e *P. strobus*) na rugosidade de superfície da liga de Co-Cr, por meio de rugosímetro de superfície, após uso simulado de 5 anos;
4. Avaliar o efeito de três dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais (*E. citriodora*, *M. alternifolia* e *P. strobus*) na alteração de brilho da superfície da liga de Co-Cr, por meio de espectrofotômetro, após uso simulado de 5 anos.

A hipótese nula deste trabalho foi que não haveria diferença na ação antibiofilme quanto na alteração da superfície metálica de Co-Cr com a utilização dos dentifrícios experimentais selecionados.

3. Revisão de Literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

Dills et al. (1988) realizaram dois experimentos utilizando dentífrício e peróxido alcalino para a higienização de Próteses Parciais Removíveis (PPRs) a fim de verificar a capacidade em reduzir a viabilidade de bactérias. Na primeira fase do estudo, foram escolhidos quatorze usuários de próteses para um experimento *crossover*, cruzado e duplo cego. Inicialmente, as PPRs foram higienizadas por meio da escovação com dentífrício e utilização de ultrassom. Durante 48 horas, os usuários seguiram as recomendações de não realizar quaisquer métodos de higienização em suas próteses. No terceiro dia do experimento, foram distribuídos e direcionados a diferentes tipos de higienização: A) Escovação com Dentu-Cream; B) Imersão em Efferdent (peróxido alcalino) por 12 minutos a 45°C, C) escovação com Dentu-Cream e, posteriormente, imersão em Efferdent; D) Nenhum tratamento higienizador. Na segunda fase do estudo, foram selecionados dezesseis usuários de próteses totais maxilares para o mesmo tipo de experimento *crossover* e duplo cego, entretanto, os usuários foram orientados a não realizar nenhum método higienizador pelas 72 horas seguintes. Após este período, as próteses foram limpas em água corrente. De acordo com os resultados, a imersão das próteses causou maior redução dos microrganismos do que a escovação com dentífrício. Além disso, combinar a escovação com a imersão não reduziu significativamente mais o nível de microrganismos que a imersão sozinha. Como o peróxido alcalino provou ter ações antimicrobianas, concluiu-se que, para higienização apropriada, o ideal é a combinação da escovação da prótese com um higienizador para imersão.

Drake et al. (1992) verificaram a eficácia de higienizadores de imersão em reduzir UFC/mL de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* em próteses. Para tanto, confeccionaram corpos de provas retangulares nas medidas de 15 x 25 mm, que foram extraídos das bases de resinas acrílicas das PPRs. Foram contaminados com os microrganismos. Após a contaminação, os corpos de prova foram divididos em grupos: 1) Efferdent, 2) Polident. Ambos submetidos a imersões de 12 minutos e, posteriormente, lavados em água destilada estéril. Foram retiradas amostras das superfícies, colocadas tubos de ensaios com PBS estéril e agitação em cuba ultrassônica por 10 segundos. Após isso, foram cultivadas as soluções diluídas. De acordo com os resultados, os dois higienizadores não foram eficientes contra *C. albicans*, porém, reduziram a aderência de *S. mutans*.

Taylor et al (1998) propuseram a análise do efeito de acabamento na contaminação por microrganismos. Para tanto, compararam a retenção de *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* e *Actinomyces viscosus* em resinas acrílicas e em amostras de Co-Cr polida, jateada (fina e grossa granulação) e eletrobrilho para avaliar in vitro o efeito de tais técnicas na contaminação de próteses. Suspensões dos microrganismos foram incubados com os materiais de teste, a 37°C, por uma hora. Posteriormente, as células dos microrganismos retidas foram contadas usando análise de imagem (percentagem de área de um campo microscópico coberto por células). A retenção de células bacterianas foi substancial (*S oralis* 12% a 20% e *A viscosus* 9% a 16%), independentemente do acabamento da superfície. . A máxima retenção de microrganismos deste experimento foi encontrada nos espécimes de Co-Cr que foram expostos ao jateamento de fina granulação e eletrobrilho. Para *C albicans*, um aumento na rugosidade da superfície (0,15 a 3,53 µm) resultou em um aumento na retenção (3% a 9%). A retenção dos microrganismos foi diretamente afetada pelo tamanho das células e o tipo de rugosidade.

Nikawa et al. (1999) dedicaram-se à revisão de cerca de vinte e cinco artigos que tratavam sobre a efetividade de higienizadores de próteses, destacando os prós e os contras presentes em cada método. Nos métodos in vitro e in vivo, obtiveram resultados múltiplos, que se diferenciavam conforme o método. Por conseguinte, apontaram a eficácia duvidosa dos higienizadores químicos de PPR em uso clínico, diferente dos apontamentos adquiridos nos testes in vitro. Este resultado estaria relacionado à ausência de um padrão metodológico e à presença de resultados discrepantes. Como forma de solucionar tais questões, os pesquisadores sugeriram a inclusão, nos informativos dos produtos, da eficácia dos higienizadores por meio dos dois métodos, in vitro e in vivo, além da utilização de métodos qualitativos e quantitativos do biofilme.

Wataha et al. (1999) avaliaram os efeitos da escovação dental diária sobre a liberação de partículas de ligas metálicas nobres (Au-Pt; Au-Pd; Pd-Cu-Ga) e liga de níquel-cromo (Ni-Cr). Por meio da análise de perda de massa (espectroscopia de absorção atômica) mediram a liberação elementar dessas ligas. As escovações foram realizadas com escovas dentais macias, durante 30 minutos, 90 ciclos/min., sob 200 gramas de força, com solução salina neutra ou ácido láctico, com ou sem uso de dentifrício associado. Concluíram que dentifrícios, soluções ácidas ou

combinações dessas condições propiciam aumento da liberação de elementos químicos das ligas metálicas para uso odontológico, causando danos às superfícies.

Keyf e Gungor (2003) avaliaram se o Corega Tabs e o hipoclorito de sódio (3%) poderiam causar resultados prejudiciais na superfície de liga metálica de Co-Cr. Para esta análise, foram confeccionados dezenove corpos de prova separados em três grupos: água de torneira (controle/ n=6), Corega Tabs (n=6) e clareador Axion (à base de hipoclorito de sódio/ n=7). Os corpos de prova tiveram suas massas avaliadas e, posteriormente, foram submersos em soluções preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Tais soluções foram trocadas a cada 12 horas, sendo que os corpos foram imersos 30 minutos uma vez ao dia durante 30 dias. As análises basearam-se na observação das amostras, antes e após os tratamentos, com um espectrofotômetro, avaliando a reflectância, as possíveis alterações de superfície com um microscópio de luz e análise da massa. Posteriormente, os pesquisadores evidenciaram que as soluções de limpeza à base de peróxido e hipoclorito de sódio demonstraram efeitos prejudiciais na superfície da liga de Co-Cr, tais como descoloração e manchas. Apesar disto, a massa manteve-se. Corega Tabs modificou a reflectância da superfície, porém com um efeito nocivo um pouco menor que o hipoclorito de sódio. Concluíram que o Corega Tabs apresenta relativa segurança para o uso.

Andrucioli et al. (2004) compararam dois dentifrícios, quanto à eficácia da remoção de biofilme, melhora de lesões de palato, em pacientes com candidíase atrófica crônica, correlacionando também, biofilme e grau de eritema. Foram selecionados 24 pacientes (45-80 anos) e distribuídos em grupos: a) dentifrício específico (produto experimental); b) dentifrício convencional (Sorriso). Todos os grupos utilizaram escovas dentais de cerdas macias. As superfícies internas das próteses superiores foram evidenciadas com fluoresceína 1% e fotografadas (45°) em 4 momentos (0, 15, 30 e 60 dias). As lâminas foram digitalizadas e as áreas de interesse (área total da prótese e área do biofilme) foram medidas (software Image Tool). O grau de eritema foi avaliado em lâminas de acordo com o Prosthesis Tissue Index. Entre as primeiras visitas (0 e 15 dias) e as últimas (45 e 60 dias), teve uma significativa redução dos níveis de biofilme e dos escores de eritema da primeira para quarta visita para ambos os dentifrícios. Houve diferença entre os dentifrícios em relação aos níveis de biofilme e semelhança estatística para os escores de

eritema. O dentifrício específico foi efetivo, mostrando que o uso de higienizador em forma de dentifrício é possível manter a manutenção da higiene de próteses totais.

Paranhos et al. (2007a) analisaram os possíveis resultados decorrentes dos métodos químicos e mecânicos aplicados no cômputo do biofilme na superfície interna de próteses dentárias. O estudo centrou-se em portadores de próteses totais (PTs) há mais de um ano e no acúmulo de biofilme existente na superfície interna. Os usuários foram instruídos a proceder a higienização por um período de sete dias, de acordo com o grupo pré-estabelecido, e as próteses foram fotografadas antes e após cada procedimento com o intento de avaliar, percentualmente, a diminuição do biofilme. Os pacientes foram divididos da seguinte maneira: 1) Grupo controle: lavagem da prótese com água após as refeições, com imersão noturna em água; 2) Grupo químico: lavagem da prótese com água após o desjejum e almoço e, após o jantar, imersão por cinco minutos em Bonyplus (solução de peróxido alcalino); 3) Grupo mecânico I: escovação, três vezes ao dia durante dois minutos, com escova da marca Johnson & Johnson (cerdas macias) e Dentu Creme; 4) Grupo Combinação I: união dos métodos dos grupos 2 e 3; 5) Grupo mecânico II: escovação, três vezes ao dia durante dois minutos, com escova da marca Oral B (cerdas macias) e Dentu Creme; 6) Grupo Combinação II: união dos métodos dos grupos 2 e 5. O grupo controle apresentou menor redução de biofilme frente aos demais métodos, enquanto os métodos 3, 5, 4 e 6 demonstraram resultados similares e superiores ao grupo 2. Apesar de todos os métodos utilizados ocasionarem diminuição na quantidade de biofilme, os pesquisadores concluíram que o método mecânico ou a união deste com um método químico de higienização foi o mais eficiente na limpeza das próteses.

Em outro experimento, Paranhos et al. (2007b) analisaram os efeitos de seis métodos higienizantes na quantidade de biofilme presente na parte interna de PTs. Ao todo, trinta e cinco pacientes foram distribuídos de acordo com os seguintes métodos: 1) Controle – enxague com água de torneira após o desjejum, almoço e jantar e imersão noturna. 2) Químico – enxague com água de torneira após desjejum e almoço e imersão noturna de cinco minutos em Bonyplus (peróxido alcalino). Antes da inserção na cavidade bucal, foi realizado novo enxague com água da torneira. 3) Mecânico I – escovação por três vezes ao dia (após as refeições) com escova de cerdas macias Johnson & Johnson e Dentu Creme, com imersão noturna em água. 4) Combinação I – métodos 2 e 3 juntos. 5) Mecânico II - escovação por

três vezes ao dia (após as refeições) com escova Oral B nº 40 e Dentu Creme. 6) Combinação II – união dos métodos 2 e 5. Todos os pacientes, aleatoriamente, realizaram todos os métodos, cada um sendo executado por 21 dias. Os biofilmes passaram por análises e quantificações através de fotografias digitais das superfícies internas, sendo evidenciadas relevantes diferenças em seus percentuais de cobertura em cada método utilizado. No método 1 foram observados os maiores valores, enquanto o método 2 mostrou-se intermediário e, os demais, demonstraram valores menores. Os autores relataram que o método 6 foi o mais eficaz e, ainda, que, em todos os métodos, constatou-se que o biofilme se acumulava em determinadas zonas da base da prótese. Além disso, a escovação foi comprovada mais eficaz do que a solução de peróxido alcalino testada, contudo, a higienização das próteses totais foi mais eficaz com a junção dos dois métodos.

Salles et al. (2007) compararam e correlacionaram os níveis de biofilme em próteses totais (PTs) superior e inferior após escovação, associado a dentifrício específico e sabão neutro, por meio de metodologia computadorizada. Quarenta e cinco usuários de PTs foram selecionados e orientados a realizar a limpeza de suas próteses com escovação (Soft Oral B 40), 3 vezes por dia, durante 3 semanas, e divididos Experimento 1: água (Controle) e dentifrício específico para prótese total (Corega Brite); e Experimento 2: sabão neutro. Para obter e analisar a quantidade de biofilme, as superfícies internas das próteses foram tingidas de vermelho neutro (1%), fotografadas com câmera digital (Canon EOS Digital) e o através de um software (Image Tool 2.0), o biofilme foi medido. Para avaliação dos produtos utilizados para higienização, foi feito questionário, frente às suas propriedades de higiene e aceitação dos pacientes. As próteses inferiores exibiram porcentagem média de biofilme, significativamente maior que as próteses superiores e que a escovação com dentifrício (Experimento 1) foi mais eficaz que o sabão (Experimento 2) e, por sua vez, foi mais eficaz do que água (Controle). Ambos os produtos foram bem aceitos pelos pacientes, mas o mais preferido foi o dentifrício. Portanto, concluíram que o dentifrício foi eficaz no controle do biofilme e pode ser utilizado na prevenção e manutenção da saúde bucal de pacientes usuários de PTs.

Silva et al. (2008) aferiram o potencial de seis higienizadores distintos de PPRs que possuíam superfícies de resina acrílica. Foram selecionados: hipoclorito de sódio a 1% (HP 1%); digluconato de clorexidina a 2% (DC 2%); glutaraldeído a 2% (G 2%); vinagre a 100% (V 100%); pastilhas efervescentes à base de perborato

de sódio (PE); perborato de sódio a 3,8% (PS 3,8%). Os microrganismos selecionados foram *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia colie* e *Bacillus subtilis*. Seguidamente ao período incubatório, os espécimes passaram pela imersão nos higienizantes por 10 minutos e, em seguida, foram imersos em solução salina no intento de separar as células fracamente aderidas. A solução remanescente foi diluída e semeada em meios específicos, sendo que o número de Unidades Formadoras de Colônias foi contabilizado a seguir. De acordo com os resultados os métodos 1, 2 e 3 mostraram maior eficácia contra todos os microrganismos, seguidos pelos métodos 4, 6 e 5. O perborato de sódio a 3,8% demonstrou ser mais eficiente que as pastilhas efervescentes à base de perborato contra os microrganismos *C. albicans* e *S. mutans*. Os pesquisadores concluíram que os métodos higienizadores HP 1%, DC 2%, G 2% e OS 3,8% são possibilidades confiáveis para a desinfecção de próteses que possuem superfícies de resina acrílica.

Watanabe et al. (2008) avaliaram a eficácia de enxaguatórios bucais à base de cloreto de cetilpiridínio (CPC) contra *S. aureus*. Um método de diluição em água foi utilizado para precisar a máxima diluição inibitória de quatro enxaguatórios bucais com CPC: 1) CPC + Propólis; 2) CPC + Malva; 3) CPC + Eucaliptol + Juá + Romã + Própolis; 4) Cepacol (CPC). O estudo foi realizado em 28 cepas de *S. aureus* e foi calculada a máxima diluição capaz de impossibilitar o crescimento microbiano. Após os testes, os pesquisadores concluíram que os enxaguantes à base de CPC possuem eficiente ação antimicrobiana, a qual pode ser ampliada com a junção de outras substâncias, como malva, eucaliptol, própolis, romã e juá.

Lee et al (2009) observaram a efetividade de higienizadores na eliminação de biofilmes planctônicos de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA – 15 e MRSA – 16). Os biofilmes apresentavam diferentes estágios de maturação e foram utilizados corpos de provas confeccionados em resina acrílica. Selecionaram três higienizadores: 1) Solução de Milton - hipoclorito de sódio a 2%; 2) Perform - Solução desinfetante liberadora de oxigênio 2%, livre de aldeído; 3) Steradent - 1,5% de solução de peróxido alcalino. O controle baseou-se em uma solução salina. A princípio, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima dos agentes antimicrobianos e, com a utilização de um dispositivo de formação de biofilmes, criou-se o biofilme sobre exemplares de resina acrílica. A segunda etapa do estudo consistiu na análise de biofilmes em quatro fases: planctônico, sésil (após 4 horas),

estabelecido (após 24 horas) e maduro (após 120 horas). Os protótipos foram retirados após 4, 24 e 120 horas de formação de biofilme e imersos em cada solução higienizadora ou em solução salina por períodos de 1, 5 ou dez minutos. Na etapa seguinte, foram colocados em uma solução tampão e agitados por cerca de um minuto para que as diluições seriadas fossem obtidas. Estas, por sua vez, foram semeadas e incubadas por 24 horas. Ao final desse intervalo, ocorreu a contagem das colônias e o estabelecimento das porcentagens de células viáveis. Concluíram que o hipoclorito de sódio a 2% foi o mais eficiente com CIM de 0,03%, Perform apresentou CIM de 0,12% e Steradent de 0,09% (MRSA - 15) e 0,38% (MRSA - 16). No biofilme de 4 horas, os higienizadores mostraram efetividade, sendo que o hipoclorito a 2% foi eficaz com 1 minuto de imersão. Já os biofilmes de 24 h e de 120 h demonstraram maior resistência à ação higienizadora do Perform e do Steradent, mas, o hipoclorito mostrou eficácia, também, após 1 minuto de imersão. Logo, dentre os higienizadores analisados, o Steradent demonstrou menor eficiência. Ainda, os pesquisadores observaram que os biofilmes de MRSA de 120 são mais complexos de eliminar, sendo que o hipoclorito de sódio a 2% foi o único capaz de erradicar todos os biofilmes.

Ferreira et al (2009) avaliaram a eficácia de limpadores de dentaduras na aderência de *Candida albicans* e *Candida glabrata* em revestimentos de dentaduras e correlacionaram a rugosidade superficial (Ra) dos materiais com a aderência de *Candida*. Foram feitos espécimes de três revestimentos de próteses: à base de polimetilmetacrilato (PMMA) macio e duro; e à base de silicone macio. Eles foram preparados e tiveram seu Ra medido. As amostras foram divididas aleatoriamente para ensaios de aderência com *C. albicans* ou *C. glabrata*. Após a contaminação com os fungos, os espécimes foram tratados com: água (controle), uma solução de limpeza enzimática, uma solução de limpeza ou uma solução de NaOCl 0,5% por imersão por 3, 15 ou 10 minutos, respectivamente. O número de células de *Candida* restantes após o tratamento foi determinado por microscopia de luz (x400). Os resultados obtidos foram que o Ra do revestimento à base de silicone foi menor que a dos revestimentos à base de PMMA. Os resultados globais mostraram alta adesão de *C. glabrata*. Os menores níveis de células de *Candida* remanescentes foram encontrados para o tratamento com NaOCl 0,5%. Não houve correlação entre Ra e aderência de *C. albicans* em todos os materiais testados. A redução da aderência de

ambas as espécies de *Candida*, em todos os materiais testados, só foi capaz pela solução de NaOCl 0,5%.

Paranhos et al. (2009) analisaram e compararam três métodos distintos de higienização de PTs, sendo químico, mecânico e a associação de ambos. Os microrganismos selecionados foram: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. Foram produzidos 220 espécimes de resina acrílica, que foram esterilizados com óxido de etileno e contaminados com a suspensão microbiana a 10⁶ UFC/ml. De forma aleatória, os espécimes foram divididos entre os seguintes grupos: 1) Método químico – imersão de 5 minutos em 200 mL de água destilada a 37°C junto à pastilha efervescente Bonyplus (peróxido alcalino); 2) Método mecânico – escovação por 20 segundos com escova TEK - Johnson & Johnson (cerdas macias) e dentífrício específico para próteses Dentu Creme, seguido de imersão por 5 minutos em água destilada; 3) Método Associado: utilização do método mecânico seguido pelo método químico; 4) Controle Negativo – prótese sem contaminação imersa em água destilada e esterilizada por 5 minutos. Ao que tange aos microrganismos *S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, os métodos não demonstraram significativa diferença. Contudo, para *C. tropicalis* e *E. Coli*, a combinação dos métodos foi a mais eficaz. Para *E. faecalis*, *C. albicans* e *C. glabrata* foi observada efetividade dos métodos 2 e 3. Por fim, na maioria dos espécimes avaliados, os métodos mecânico e combinado apresentaram resultados semelhantes e mais eficazes que o método químico. Desta maneira, os pesquisadores concluíram que a efetividade dos métodos de higienização analisados se transforma de acordo com o biofilme microbiano.

Panzeri et al. (2009) analisaram as propriedades físicas, o efeito na remoção do biofilme protético e propriedades antimicrobianas de dois dentífrícios experimentais para higienização de próteses totais. Um foi baseado na adição de 1% de cloramina T (D1) e o outro na presença de 0,01% de fluorosurfactante (D2). Foram realizadas medidas de densidade, pH, consistência, características reológicas e abrasividade. Sessenta usuários de PTs foram distribuídos aleatoriamente em três grupos e instruídos a escovar suas próteses com uma escova de dentes específica: (1) Água (controle); (2) D1; ou (3) D2. Cada método foi utilizado por 21 dias. O biofilme da prótese foi revelado por uma solução vermelha neutra a 1% e quantificado por meio de fotos digitais tiradas da superfície interna. A

avaliação microbiológica foi realizada para quantificar *Candida sp.* e *Streptococcus mutans*. Ambos os dentifrícios diminuíram a cobertura de biofilme quando comparados com o grupo controle. D1 foi o tratamento mais eficaz para reduzir *S. mutans*, enquanto D2 apresentou resultado intermediário. Nenhum tratamento influenciou espécies de *C. albicans* ou outros tipos de *Candida*. Concluíram que a escovação das PTs com os dentifrícios experimentais testados pode ser eficaz para a remoção do biofilme da prótese.

Li et al. (2010) analisaram a efetividade do higienizador Polident em biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans* e, também, em biofilme híbrido proveniente de saliva humana, sendo este com ou sem *C. albicans*. Os corpos de prova, em formato de disco, eram compostos de hidroxiapatita, resina acrílica, poliestireno e cerâmica. Foram esterilizados e inseridos com os biofilmes por um período de 20 horas. No que tange ao *S. mutans*, a biomassa mostrou-se semelhante nos distintos materiais, exceto na hidroxiapatita, onde foi verificado número maior de colônias. *C. albicans* demonstrou menor adesão e biomassa em hidroxiapatita e similaridades nos demais materiais. Quanto a saliva e seus biofilmes, com ou sem a adesão de *C. albicans*, houve menor biomassa e aderência em hidroxiapatita, quando comparado aos outros materiais. Através da leitura de UFC, chegou-se as constatações de que: 1) Para *S. mutans* e *C. albicans* ocorreu leitura zero em poliestireno; 2) Na hidroxiapatita não foi observada diferença considerável para a *C. albicans*, porém, houve redução relevante do mesmo microrganismo nas resinas cerâmica e acrílica; 3) *S. mutans* apresentou redução significativa em todos os materiais; 4) No biofilme de saliva humana sem a adição, foi verificada redução considerável de microrganismos nos materiais, com UFC zero em resina acrílica; 5) No biofilme salivar com adição de *C. albicans*, em leituras de microrganismos totais e isolados, não foram percebidas reduções importantes de *C. albicans* em hidroxiapatita e foi obtida leitura de UFC zero em poliestireno. Quanto aos outros materiais, foi observada diminuição significativa de *C. albicans* isolada no biofilme misto; 6) Quanto aos microrganismos totais, a leitura zero foi verificada em cerâmica, com redução considerável nos demais materiais. Desta maneira, os autores concluíram que um mesmo microrganismo pode apresentar diferenças em relação ao higienizador e material onde se encontra.

Silva-Lovato et al. (2010) pesquisaram a aplicabilidade do NitrAdine para a eliminação de biofilme e ação antimicrobiana em PTs. Para tanto, distribuíram,

aleatoriamente, 40 usuários de próteses em dois grupos, e avaliaram por vinte e um dias, os seguintes métodos de higienização: 1) Escovação (controle) – realizada três vezes ao dia, após as refeições, com água e escova própria para próteses; 2) Escovação e Imersão - realizada três vezes ao dia, após as refeições, com água e escova própria para próteses; 3) Imersão da prótese em NitrAdine. Os biofilmes das superfícies internas das próteses foram corados, fotografados e analisados no intuito de quantificar *Candida ssp.* Como resultado, observou-se redução da quantidade de biofilme e número de colônias de leveduras nas próteses quando utilizado NitrAdine em comparação com o grupo controle. Assim, os pesquisadores apontaram que o uso de pastilhas NitrAdine para a higienização pode ocorrer de forma rotineira em PTs, no intuito de coibir o desenvolvimento de biofilme microbiano causador de estomatite relacionada à prótese.

Pisani et al. (2010), avaliaram dentifrícios convencionais (Sorriso e Corega Brite) e experimentais, um à base de Cloramina T, agente antimicrobiano e outro contendo Zonyl, um detergente, em bases de próteses de resina acrílica. Dos dentifrícios testados, os experimentais mostraram-se menos abrasivos e resultaram na menor perda de massa após a escovação do acrílico. Tal fato pode ser explicado pelas propriedades abrasivas de cada dentifrício. O dentifrício convencional da marca Corega contém partículas abrasivas duras de bicarbonato de sódio e sílica, enquanto o da marca Sorriso é composto por carbonato de sódio, um agente abrasivo insolúvel em água capaz de causar perda de massa e aumento da rugosidade. Os dentifrícios experimentais continham apenas sílica como abrasivo. Com isso, concluíram que em relação às propriedades avaliadas do estudo, a utilização de dentifrícios experimentais pode ser indicada, no entanto, salientaram a necessidade de avaliação da capacidade de remoção de biofilme.

Uludamar et al. (2010) avaliaram o potencial de eliminação de *C. albicans* em biofilme de prótese total, três pastilhas efervescentes com ação higienizadora (Polident, Efferdent e Fittydent) e dois enxaguantes bucais, um à base de clorexidina a 2% (CloSYS II) e um à base de dióxido de cloro (Corsodyl). Noventa usuários de próteses, com sinais de estomatite, foram distribuídos em seis grupos que, por sua vez, foram divididos em três subgrupos cada. Nestes, as próteses passavam por desinfecções de 15, 30 e 60 minutos. No grupo controle, as próteses foram submetidas ao tratamento com água destilada durante todo o período do teste. Nos demais subgrupos, os enxaguatorios Polident e Efferdent promoveram significativa

diminuição de *C. albicans* quando comparado ao grupo controle, enquanto o Fittydent apresentou redução significativa do número de *Candida spp* após 60 minutos de imersão. Assim, diante de tais contatações, os estudiosos destacaram que o uso de enxaguatórios é capaz de reduzir de forma expressiva o número de microrganismos do biofilme de PTs.

Andrade et al (2011) analisaram a ação antimicrobiana de pastilhas efervescentes e ultrassom na diminuição de *Candida spp.* e *Streptococcus mutans* em biofilmes de próteses totais. setenta e sete usuários de próteses totais foram distribuídos em grupos: 1) Controle (escovação com água); 2) Imersão em Pastilhas Efervescentes (Corega Tabs); 3) Uso de Ultrassom; 4) Combinação de imersão em pastilhas efervescentes e ultrassom. Os biofilmes foram coletados antes e após vinte e um dia de tratamento. Coletaram as amostras a partir da escovação das próteses com solução salina, sendo que os microrganismos coletados foram quantificados por semeadura e contagem de UFC. Os resultados demonstraram que não foi possível notar diferenças importantes entre os métodos utilizados. Após os métodos 2 e 4, leve diminuição na quantidade de UFC de *S. mutans* foi percebida na comparação dos resultados com outros métodos. Por sua vez, o método 2 constatou menor quantidade de microrganismos aeróbicos do que os presentes no método 1, e os métodos 3 e 4 apresentaram valores intermediários. Os estudiosos salientaram que as pastilhas efervescentes causaram diminuição de *S. mutans* e do total de aeróbios do biofilme da prótese. O ultrassom demonstrou efeito antimicrobiano reduzido e nenhum método foi eficaz contra *C. albicans*.

Andrade et al. (2011) concentraram suas pesquisas na ocorrência de *S. mutans* (forma séssil) em PTs superiores, posteriormente ao uso de dentifício específico para a higienização de PTs. Também determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) e a diluição inibitória máxima (DIM) dos enxaguantes Cepacol, Plax e Periogard. Formaram-se dois grupos onde 77 usuários de próteses foram distribuídos: A) Grupo Controle: escovação com Kolynos Super Branco (dentifício convencional); B) Grupo Teste: escovação com dentifício experimental. As próteses tiveram os biofilmes coletados no início e após 90 e 180 dias de tratamento. Para a contagem das colônias de *S. mutans*, foram realizadas as diluições decimais seriadas e as amostras obtidas foram semeadas em ágar sacarose bacitracina. A identificação das colônias de *S. mutans* ocorreu a partir de testes de fermentação de açúcares, procedimento que foi seguido pela adição de

BHI (caldo de infusão de cérebro e coração) aos enxaguantes antissépticos. A semeadura das colônias se deu em placas de Petri através da utilização do multiplicador de Steers. Após o período incubatório, a CIM e a DIM dos enxaguatórios foram estabelecidas. Nos dois grupos analisados, o número de *S. mutans* demonstrou diminuir desde o início até os 180 dias. No grupo B, leve diminuição da ocorrência de *S. mutans* foi percebida após 90 dias, o que não ocorreu no grupo A. Tratando-se dos enxaguatórios selecionados, Periogard apresentou os melhores resultados em atividades antimicrobianas, sendo Cepacol e Plax os seguintes.

Felipucci et al. (2011a) analisaram os efeitos de diferentes soluções higienizadoras na superfície de PPRs. Para tanto, utilizaram cinco espécimes para cada situação experimental, constituídas por um disco metálico, com as medidas de 12 x 3 mm, o qual era centralizado em uma tira de resina, que contabilizava as medidas 38 x 18 x 4 mm. Foram analisadas as ligas de Co-Cr Vera PDI e Degudent. Dentre as soluções, foram selecionadas hipoclorito de sódio a 0,05 %, pastilhas efervescentes à base de perborato de sódio (Corega Tabs e Polident), à base de ácido cítrico (Medical Interporous) e enxaguatórios bucais (Cepacol e Periogard). Foram realizadas simulações de imersões de cento e oitenta dias. Após cada imersão, foram realizadas análises de perda de massa e de rugosidade superficial por meio da utilização de uma balança de alta precisão e de um rugosímetro. Em seguida, com MEV e de EDS, foram feitas as análises ópticas e qualitativas. Foram verificadas manchas nas superfícies metálicas nos grupos submetidos ao hipoclorito de sódio 0,05% e ao Medical Interporous. Ainda nestas amostras, notou-se, com EDS, pontos de oxidação nas ligas metálicas, passíveis de percepção através das fotomicrografias e da presença de oxigênio. Quanto à rugosidade, não foram perceptíveis alterações por estas soluções nos metais ou nas resinas acrílicas termopolimerizadas. No que tange a alteração na massa e a sua possível perda, a liga Vera PDI relacionada às soluções Corega Tabs e Medical Interporous demonstrou maiores valores. Além disso, observaram que o hipoclorito de sódio a 0,05% e pastilhas à base de ácido cítrico são responsáveis por efeitos nocivos aos componentes metálicos das PPRs, particularmente manchas e corrosões pontuais. Concluíram que as soluções Cepacol, Polident e Periogard não demonstraram ações prejudiciais, podendo ser utilizadas como coadjuvantes na escovação de PPR.

Felipucci et al. (2011b) observaram, em espécimes mistos de metal e resina, a liberação de íons e a perda de massa. A simulação durou 180 dias em soluções higienizadoras. Foram elaborados 70 discos metálicos (12 mm x 3 mm) fixados em tiras de resina acrílica (38 mm x 18 mm x 4 mm) de duas ligas metálicas de Co-Cr: DeguDent (DD), e VeraPDI (VPDI). Testaram 7 higienizadores: Periogard, Cepacol, Corega Tabs, Medical Interporous, Polident, Hipoclorito de sódio a 0,05% e, como controle, água destilada (AD). A quantidade de massa foi analisada antes e após os testes. Os pesquisadores aferiram que Corega Tabs e Medical Interporous demonstraram valores maiores quanto à perda de massa, sendo que a alteração maior ocorreu na liga VPDI quando comparada à liga DD. A maior liberação de íons ocorreu nas soluções de hipoclorito de sódio a 0,05% e na Medical Interporous. Chegaram à conclusão de que as soluções químicas de hipoclorito de sódio a 0,05% e Medical Interporous não são adequadas para higienização de PPR.

Andrade et al. (2012) avaliaram a eficácia de dentifrícios experimentais para a remoção do biofilme de próteses por meio de um ensaio randomizado cruzado. Trinta voluntários escovaram suas próteses usando uma escova e quatro dentifrícios: (1) Corega refrescante menta (controle), (2) cloramina T 0,2%, (3) cloramina T 1,0% e (4) fluorosurfactante 0,01%. Cada dentifrício foi utilizado por 7 dias e os participantes foram randomizados para usá-los de acordo com uma das quatro sequências. O biofilme foi divulgado (vermelho neutro) após cada período, fotografado e quantificado por meio de um software (Image Tool 3.0, UTHSCSA). Todos os dentifrícios experimentais apresentaram mesma eficácia em termos de remoção de biofilme.

Peracini et al. (2012) investigaram o efeito das soluções higienizadoras para o controle do biofilme. Trinta e dois usuários de próteses totais seguiram as orientações de escovar as próteses, três vezes por dia, com escova Denture e sabonete líquido. Durante a noite, os usuários imergiam as próteses nas seguintes soluções: A) Controle: água natural; B) Corega Tabs (Peróxido alcalino) e C) Hipoclorito de sódio a 0,5%. Cada solução foi usada por 21 dias divididos em três ciclos de sete dias. No fim de cada ciclo, aplicou-se vermelho neutro a 1% na superfície interna da prótese, sendo esta fotografada para a quantificação do biofilme corado por meio do *software* Image Tool 3.0. Concluiu-se que a imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% foi mais eficaz, demonstrando remoção significativa do biofilme das PTs em relação ao controle e à pastilha efervescente.

Ramage et al. (2012) avaliaram a eficácia antifúngica de óleo da árvore do chá (OAC) e derivados-chave contra biofilmes de *Candida albicans*, avaliar os efeitos toxicológicos de OAC em uma linha celular oral clinicamente relevante e investigar seu impacto na inflamação. OAC e seus derivados foram examinados contra 100 cepas clínicas de *C. albicans*. As concentrações inibitórias mínimas planctônicas (CIM) foram determinadas usando o método de microdiluição em caldo CLSI M-27A. As CIM sésses foram determinadas usando um ensaio de redução de XTT. Foram realizados estudos de inibição, time-kill e modo de ação. As células epiteliais OKF6-TERT2 foram utilizadas para ensaios de citotoxicidade e expressão de citocinas. Isolados planctônicos de *C. albicans* foram suscetíveis a OAC, terpinen-4-ol (T-4-ol) e α -terpineol, com CIM (50) de 0,5, 0,25 e 0,25%, respectivamente. Esses três compostos também apresentaram atividade potente contra as 69 cepas formadoras de biofilme, das quais T-4-ol e α -terpineol apresentaram cinética de morte rápida. Para todos os três compostos, 1 x CIM (50) inibiu efetivamente o crescimento de biofilme quando *C. albicans* foram tratados em 0, 1 e 2 h após a adesão. Por análise de microscopia eletrônica de varredura e absorção de PI, OAC e componentes derivados mostraram ser ativos na membrana celular. Demonstraram que o óleo OAC apresentou potencial para regressão de casos de Estomatite Protética em pacientes sob tratamento oncológico. Os autores comprovaram a ação antimicrobiana de dois componentes do OAC - [terpinen-4-ol (T-4-ol) e [α -terpineol] - frente a biofilmes de *C. albicans* e recomendaram a utilização dessa substância natural em produtos profiláticos de higiene bucal, tais como enxaguatórios bucais e higienizadores de prótese.

Sorgini et al. (2012) avaliaram a rugosidade superficial e perda de massa causada em espécimes de plexiglass por dentifrícios convencionais (Sorriso, Colgate e Close Up) e dentifrícios específicos utilizados para limpeza de próteses (Corega e Dentu Creme). Os espécimes de plexiglas foram divididos em 6 grupos (n=6): controle (água destilada - AD). Foi realizada a escovação em máquina de escovação com escova dental macia e suspensões dos dentifrícios e AD, com diferentes tempos de escovação (50, 100, 200 e 250 min) correspondendo um total de 5 anos de escovação regular. A escovação com DW (controle) não causou perda significativa de massa ou alteração da rugosidade superficial nos corpos de prova. Os dentifrícios causaram perda de massa em todos os tempos. Após 50 e 100 min de escovação, todos os dentifrícios causaram perda de massa

semelhante. Aos 200 e 250 min, Close Up e Corega causaram maior perda de massa. Os dentifrícios causaram mudanças significativas na rugosidade superficial somente após 200 e 250 min de escovação. Após 250 min de escovação, Sorriso causou as maiores mudanças na rugosidade da superfície.

Badaró et al. (2017) avaliaram clinicamente soluções higienizadoras à base de hipoclorito alcalino 0,25% e 0,5% e de *Ricinus communis* 10%. Os seguintes aspectos foram analisados: capacidade de remoção do biofilme de superfícies internas de PTs; influência na remissão de candidíase atrófica crônica e avaliação, por meio de questionário, da satisfação do paciente quanto à utilização. Foram selecionados 64 usuários de PT, dentre estes 40 com ausência de candidíase e 24 com a presença. Os usuários foram orientados a escovar as próteses com escova específica e sabão neutro por três minutos, três vezes ao dia e imergi-las, por 20 minutos, nas soluções higienizadoras durante sete dias. As soluções foram utilizadas de forma cruzada e randomizada com intervalos de *wash out*. Através da evidenciação do biofilme das próteses e fotografias, o biofilme foi quantificado e os resultados interpretados pelo *software* Image Tool 3.0 no fim de cada período. A remissão da candidíase foi avaliada por atribuição de escores antes e após o uso das soluções. O questionário verificou a satisfação dos usuários. Os resultados não mostraram diferença na porcentagem de biofilme entre os pacientes com ou sem candidíase. Quanto às soluções, hipoclorito de sódio a 0,25 % e a 0,5% promoveram as menores médias de biofilme, sendo seguidos pelas soluções *R. communis* e salina. Para remissão da candidíase, as soluções mais eficientes foram *R. communis* e hipoclorito de sódio 0,25%. Os usuários não demonstraram, no questionário, preferência quanto às soluções, ambas soluções foram aprovadas pelos pacientes. Concluíram que há, para a remoção do biofilme e remissão da candidíase, efetividade na utilização do hipoclorito de sódio, em menor concentração, e do *Ricinus communis* 10%.

Lucena-Ferreira et al. (2013) analisaram se determinados higienizadores de prótese são capazes de reduzir a quantidade de microrganismos em biofilmes de PPR's. Foram selecionados 25 usuários de PPRs, os quais foram instruídos a complementar a higiene de suas próteses com imersão em peróxido alcalino, Polident, uma vez por dia, por três minutos, por um período de 15 dias. Coletaram, com o auxílio de um swab estéril, biofilme das próteses antes e depois das higienizações. O swab foi imerso em solução salina, agitado e semeado para a

quantificação de *Streptococcus spp.* e *Candida spp.* Os resultados mostraram reduções de *Streptococcus spp.*, mas nenhuma diferença em *Candida spp.* As conclusões mostraram que o uso diário de pastilhas efervescentes contribui para melhor higiene das próteses, reduzindo o total de microrganismos e de *Streptococcus spp.* de PPRs.

Paranhos et al., (2013) compararam os níveis de biofilme em PTs superiores e inferiores e avaliaram o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de leveduras, após o uso de agentes auxiliares de escovação e saliva artificial. Vinte e três usuários de próteses com hipossalivação e xerostomia foram instruídos a escovar as próteses 3 vezes ao dia durante 3 semanas com os seguintes produtos: dentífrico para próteses Corega Brite, sabonete líquido neutro, Corega Brite combinado com Oral Balance (saliva artificial) ou água da torneira. Para a quantificação do biofilme, as superfícies internas das próteses foram fotografadas e medidas por meio de um *software* Image Tool, versão 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, EUA). Para análise microbiológica, o biofilme foi descartado e o material colhido foi diluído, semeado em CHROMagar™ *Candida* e incubado a 37°C por 48 h. As próteses mandibulares apresentaram porcentagem média de biofilme significativamente maior que as maxilares. A escovação com Corega Brite combinado com Oral Balance foi mais eficaz do que o uso de dentífrico para prótese, sabão neutro ou água da torneira (controle). Concluíram que as próteses mandibulares apresentaram maior formação de biofilme que as maxilares.

Leite et al. (2014) estudaram a ação antimicrobiana de um dentífrico à base de mamona 10%, através da escovação de espécimes de resina acrílica contaminados com microrganismos como *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*. A concentração inibitória mínima do estudo foi realizada com *R. communis* em óleo puro a 2,5%. Dos microrganismos, apenas o *E. coli* não foi inibido pelo *R. communis*, mas a CIM (0.0781%) foi efetiva contra os outros. A partir destes resultados foi determinada a concentração de *R. communis* para o dentífrico experimental, 1, 2, 5 e 10%, avaliadas pelo teste de difusão em Agar. Colgate, Trihydral e Corega Brite, dentífricos, também foram analisados. O diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano foi medido com régua sob uma luz refletida. Para *E. coli*, nenhum dentífrico mostrou resultado. Para *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecallis*, os dentífricos experimentais contendo *R. communis* a 2, 5 e 10 % demonstraram eficácia, o que não ocorreu em relação à *Candida spp* e *E. coli* em

nenhuma das concentrações testadas. Quanto aos dentifrícios experimentais, *R. communis* a 10% propiciou os maiores halos de inibição do crescimento microbiano e apresentou atividade antimicrobiana similar a dos dentifrícios comerciais.

Andrade et al. (2014) observaram a eficácia da solução à base de óleo de mamona 2% na remoção de biofilme em PTs, comparando os resultados com outras duas soluções higienizadoras: hipoclorito de sódio a 1% e peróxido alcalino. Os usuários de próteses total foram aconselhados a escovar as PTs com escova e dentifrício três vezes por dia, após as principais refeições. Também utilizaram, uma vez por dia (após o jantar), os métodos químicos de imersão: soro fisiológico, hipoclorito de sódio a 1%, solução de óleo de mamona 2% por 20 minutos cada e peróxido alcalino, Polident, por 3 minutos. Cada solução foi utilizada por sete dias consecutivos. Após este intervalo, as superfícies internas foram coradas de vermelho neutro a 1%, fotografadas e os biofilmes quantificados pelo *software* Image Tool 3.0. Os resultados demonstraram grande diferença entre as soluções. O hipoclorito de sódio a 1% e o soro fisiológico foram consideravelmente díspares, já o Polident e a solução de mamona 2% apresentaram resultados medianos. As análises constataram que a solução de óleo de mamona 2% para imersão de curta duração apresentou resultados semelhantes ao peróxido alcalino na remoção do biofilme.

Lucena-Ferreira et al. (2014) observaram os efeitos de exposições diárias de um higienizador em um biofilme misto composto por seis microrganismos, sendo cinco bactérias *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis* e uma levedura *Candida albicans*. Foram confeccionados corpos de prova de resina acrílica, com rugosidade da superfície padronizada em $0,32 \pm 0,03 \mu\text{m}$. Óxido de etileno foi utilizado para esterilizar. A incubação ocorreu por quinze horas em temperatura de 37°C e, após este período, frações das pré-culturas foram transferidas para novos tubos e incubadas, na mesma temperatura, por sete horas. Com a maturação do biofilme, os espécimes foram divididos de forma aleatória em grupos sem tratamento (controle) e experimental. Neste último, os espécimes passaram por imersões diárias em Polident (peróxido alcalino com enzima) por três minutos durante sete dias seguidos. Na próxima etapa, os corpos de prova foram lavados em solução salina, inseridos em tubos com 3 mL da mesma solução e agitados em ultrassom. A suspensão resultante passou por análise do número de microrganismos e concentração de

polissacarídeos nos dias 1, 4 e 7, além das análises por microscopia eletrônica de varredura e Microscopia Confocal. Os resultados evidenciaram que o Polident reduziu, em todos os períodos, o total de microrganismos quando comparado com o controle. Contudo, em todos os biofilmes onde o higienizador foi utilizado, o número de *C. albicans* aumentou continuamente. Após sete dias, a concentração de polissacarídeo aumentou expressivamente no grupo experimental. A exposição diária de um biofilme multiespécies a um limpador de dentaduras reduz o número total de microrganismos, mas favorece o desenvolvimento de *C. albicans*. O estudo concluiu que o uso diário do higienizador em próteses é capaz de reduzir o número total de microrganismos, mas favorecendo o desenvolvimento de *C. albicans*.

Salles et al. (2015) analisaram as ações antimicrobianas de soluções de hipoclorito de sódio a 0,25% e 0,50% e solução de mamona a 10% em microrganismos específicos, sendo estes: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. glabrata*. Foram confeccionados 320 corpos de prova de resina acrílica que, após a contaminação, passaram por imersão nas seguintes soluções: 1) Hipoclorito de sódio a 0,25%; 2) Hipoclorito de sódio a 0,5%; 3) Solução experimental à base de *Ricinus communis* a 10%; 4) Solução salina – controle. Após análises, os resultados demonstraram que o hipoclorito de sódio 0,25% e 0,5% eliminaram totalmente os microrganismos. Por sua vez, a solução de mamona eliminou *B. Subtilis* e causou a redução das outras espécies. As soluções 3 e 4 evidenciaram diferenças significativas, com exceção para *E. faecalis*. Concluiu-se que as soluções de hipoclorito de sódio analisadas são eficazes, podendo ser utilizadas para o controle do biofilme em PTs.

Kiesow et al. (2016) analisaram a compatibilidade dos materiais que compõem as próteses dentárias e as ações antimicrobianas em alguns dos protocolos de higienização mais comumente utilizados. A seleção dos tratamentos avaliados foi realizada a partir de estudos efetuados com profissionais de Odontologia, levando em consideração suas recomendações e os hábitos de consumo dos usuários de próteses. Avaliaram Polident Overnight Whitening (pastilhas de limpeza de próteses), Colgate Total (dentifrício), Listerine Original (enxaguante bucal), álcool isopropílico (AI) hipoclorito de sódio 6%, sabão e vinagre. Após protocolos laboratoriais que simulavam dois anos de uso, avaliaram a integridade dos materiais que compunham as próteses, inclusive ligas metálicas e metacrilato de polimetila (PMMA). Para tanto, os métodos escolhidos foram MEV e

perfilometria. Ainda, também avaliaram os protocolos de higienização e suas ações antimicrobianas perante microrganismos habitualmente encontrados na cavidade bucal (*C. albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. mutans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*). Durante os experimentos, notou-se que os enxaguantes bucais à base de álcool e Al danificaram a superfície da PMMA, enquanto a escovação com dentífrico foi responsável por arranhões e perdas de material. Por sua vez, o hipoclorito de sódio causou poucos danos à resina de PMMA, mas foi o responsável por corrosões na liga de Co-Cr e nas soldas. As pastilhas higienizadoras causaram poucos danos a quaisquer materiais, a não ser as camadas formadas na solda. Sabão e vinagre apresentaram-se compatíveis com todos os materiais. Nos experimentos relacionados à ação antimicrobiana, o hipoclorito de sódio apresentou excelentes resultados, ao passo que enxaguantes bucais e Al necessitaram de diluições concentradas para serem eficazes. Após cinco minutos de imersão, as pastilhas higienizadoras mostraram-se eficientes contra todos os microrganismos. O dentífrico exibiu eficácia contra bactérias, mas não em combater a *C. albicans*. Vinagre, sabão, sal e bicarbonato de sódio foram ineficazes. Os pesquisadores concluíram que o hipoclorito de sódio é altamente antimicrobiano, contudo, incompatível com os componentes de metal das próteses dentárias. Por conseguinte, o enxaguatório bucal e o Al demonstraram ações antimicrobianas, mas, ao mesmo tempo, danificaram o PMMA. As pastilhas higienizadoras de próteses apresentaram boa ação antimicrobiana e compatibilidade razoável com os materiais.

Paraniello et al. (2016) observaram a eficiência da imersão associada à escovação na redução de biofilme multiespécies em resinas acrílicas. Espécimes preparadas com Lucitone 550 e Tokuyama Rebase Fast II, inoculadas com suspensão de 10⁷ células/mL de *C. albicans* e *C. glabrata* e de 10⁸ células/mL de *S. mutans*, foram limpas por meio de escovação ou imersão durante 10 segundos nas soluções: água destilada (A); ácido peracético 0,2% (Ac), digluconato de clorexidina 1% (Chx), solução água/dentífrico 1:1 (D), hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) e perborato de sódio (Pb). Microrganismos viáveis foram avaliados pelo ensaio XTT e contagem de colônias (ufc/mL). Após os testes, concluiu-se que a remoção do biofilme aumentou com escovação combinada com agentes químicos de limpeza. A imersão dos espécimes das duas resinas em Ac e NaOCl mostrou-se tão eficaz quanto a escovação.

Sedrez-Porto et al. (2016) efetuaram uma revisão literária, concentrando-se em cerca de 25 estudos que avaliavam o uso de protocolos de limpeza para PPRs através de questionários, ensaios clínicos, revisões e estudos clínicos. Após os levantamentos, observaram que a má preservação das PPRs se dá pelo pouco conhecimento sobre os hábitos de higiene e métodos de limpeza pelos usuários. Os autores concluíram que ainda não existe um protocolo que seja unânime entre todos os pacientes, mas, sim, protocolos personalizados para cada um. Ainda, salientaram a necessidade dos cirurgiões dentistas em dar instruções claras e adequadas para a manutenção e limpeza das PPRs.

Coimbra et al. (2016) pesquisaram a ação antimicrobiana de higienizadores de próteses em corpos de prova de resina acrílica. Os espécimes foram contaminados com suspensões de concentração de 106 UFC/mL de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus*, *S. mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os espécimes passaram por incubação de 48 horas a 37°C, sendo imersos em soluções higienizadoras, preparadas seguindo as instruções dos fabricantes: 1) Controle Positivo – Solução de Fosfato Salino (PBS); 2) Medical Interporous; 3) Efferdent Plus; 4) Corega Tabs; 5) Controle Negativo (sem contaminação). Após a incubação por 24 horas, o número de colônias foi contabilizado. Entre os grupos avaliados, notou-se diferença significativa. O grupo 2 foi efetivo contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. O grupo 3 mostrou eficácia contra *C. glabrata*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. O grupo 4 foi eficaz contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*. Concluíram que o higienizador Medical Interporous foi o mais eficiente, uma vez que demonstrou ação antimicrobiana sobre a maioria dos biofilmes analisados.

Veenu et al. (2016) comprovaram a atividade antimicrobiana de vários óleos essenciais; óleo de eucalipto, óleo de camomila, óleo de tea tree e óleo de cúrcuma contra *P. gingivalis*. Culturas puras de *P. gingivalis* foram cultivadas em ágar sangue seletivo. A eficácia antimicrobiana foi avaliada por teste de difusão em disco com diferentes concentrações de óleos essenciais (0%, 25%, 50% e 100%). Foi medida em milímetros a zona de inibição formada ao redor do disco, após 48 horas. A concentração dos óleos essenciais foi diretamente proporcional as zonas de inibição. Todos os óleos apresentaram atividade antimicrobiana contra *P. gingivalis* na concentração de 100%, sendo eficazes, onde o mais eficaz foi o óleo

de eucalipto, seguido pelo óleo de tea tree, óleo de camomila e óleo de cúrcuma. Concluíram que podem ser utilizados para prevenir e tratar a periodontite.

Arruda et al. (2017) observaram a eficiência de higienizadores de PTs em relação à ação antimicrobiana, remissão de estomatite relacionada à prótese (ERP) e remoção de biofilme. 50 pacientes com estomatite receberam instruções para a escovação das próteses por 20 minutos durante 14 dias com quatro soluções: 1) Solução salina – controle; 2) Hipoclorito de sódio a 0,1%; 3) Hipoclorito de sódio a 0,2%; 4) *Ricinus Communis* a 8%. Após este período, as superfícies protéticas foram coradas, fotografadas e quantificadas com o *software* Image Tool. No passo seguinte, ocorreu a escovação com solução salina e a suspensão obtida passou por diluição de 100 a 10⁻³ e semeadura de 50 mL em CHROMagar para *Candida spp.* Seguinte a incubação, foram calculadas as unidades formadoras de colônias por mililitro. A classificação de Newton foi utilizada para a classificação da estomatite dentária. As soluções 2 e 3 demonstraram menor cobertura de biofilme que a 1, algo semelhante a 4. Soluções 2 e 3 mostraram ação antimicrobiana para *Candida spp* e 4 apresentou resultados similares ao Controle. Os sinais clínicos de estomatite da prótese foram reduzidos pela solução 2 (MR=2,44), enquanto as soluções 3 e 4 mostraram resultados medianos. Os estudiosos concluíram que as duas soluções de hipoclorito de sódio foram as mais eficientes para o controle do biofilme, sendo que todas as soluções utilizadas nos testes reduziram os sinais clínicos de estomatite.

Badaró et al. (2017) avaliaram clinicamente soluções higienizadoras à base de hipoclorito alcalino 0,25% e 0,5% e de *Ricinus communis* 10%. Os seguintes aspectos foram analisados: capacidade de remoção do biofilme de superfícies internas de PTs; influência na remissão de candidíase atrófica crônica e avaliação, por meio de questionário, da satisfação do paciente quanto à utilização. Foram selecionados 64 usuários de PT, dentre estes 40 com ausência de candidíase e 24 com a presença. Os usuários foram orientados a escovar as próteses com escova específica e sabão neutro por três minutos, três vezes ao dia e imergi-las, por 20 minutos, nas soluções higienizadoras durante sete dias. As soluções foram utilizadas de forma cruzada e randomizada com intervalos de *wash out*. Através da evidenciação do biofilme das próteses e fotografias, o biofilme foi quantificado e os resultados interpretados pelo *software* Image Tool 3.0 no fim de cada período. A remissão da candidíase foi avaliada por atribuição de escores antes e após o uso das soluções. O questionário verificou a satisfação dos usuários. Os resultados não

mostraram diferença na porcentagem de biofilme entre os pacientes com ou sem candidíase. Quanto às soluções, hipoclorito de sódio a 0,25 % e a 0,5% promoveram as menores médias de biofilme, sendo seguidos pelas soluções *R. communis* e salina. Para remissão da candidíase, as soluções mais eficientes foram *R. communis* e hipoclorito de sódio 0,25%. Os usuários não demonstraram, no questionário, preferência quanto às soluções, ambas soluções foram aprovadas pelos pacientes. Concluíram que há, para a remoção do biofilme e remissão da candidíase, efetividade na utilização do hipoclorito de sódio, em menor concentração, e do *Ricinus communis* 10%.

Gautam et al. (2017), estudaram o efeito de três dentifrícios usados para limpeza de próteses e avaliar a associação positiva entre o número de passadas da escova e a rugosidade da superfície da resina acrílica. Aproximadamente 40 blocos retangulares de acrílico foram altamente polidos até que fosse obtido uma rugosidade superficial de 0 μm . Os grupos foram: água destilada – controle (AD), e os dentifrícios Patanjali Dant Kanti (PDK), Colgate Total Cream (CTC) e Cleansodent (C) (específico para higienização de próteses). A escovação foi realizada com todos os grupos e as leituras das rugosidades superficiais feitas com medidor de rugosidade (Mitutoyo, Surface Roughness Tester, Takatsu-ku, Japan). foram registradas em 0, 1.000, 9.000 e 18.000 ciclos, completando no total 5 horas. A abrasividade máxima foi de PDK, seguido por CTC e por último C, a AD não apresentou nenhuma abrasividade. Verificou-se que a rugosidade superficial é diretamente proporcional ao tipo, tamanho e espessura do componente abrasivo utilizado; o dentifrício C tem menos potencial abrasivo do que os demais dentifrícios. Dos dentifrícios testados o que obteve o maior potencial abrasivo foi PDK e o menor foi C, dentifrício específico para higienização de próteses.

Vasconcelos et al (2017) analisaram os efeitos que os higienizadores à base de peróxido alcalino podem causar na superfície de Co-Cr de próteses removíveis. Foram confeccionados corpos de prova de 12 x 3 mm e imersos nas seguintes soluções: 1) Controle; 2) Polident (P3M); 3) Steradent (S); 4) Efferdent (E); 5) Polident for Partial (PFP); 6) Corega Tabs (CT). A rugosidade das superfícies foi medida antes e após as imersões, nos períodos de meio, um, dois, três, quatro e cinco anos. A liberação de íons foi analisada para Co, Cr e molibdênio (Mo). Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) foram realizadas em uma amostra de cada grupo.

Após as análises, percebeu-se que não houve diferença significativa na rugosidade da superfície ao comparar as soluções e os tempos de imersão. Sobre a liberação de íons CT, E e controle produziram uma maior liberação de íons Co do que S. O CT produziu maior liberação de íons Cr do que o controle, S e P3M. Finalmente, E causou a maior liberação de íons Mo. As soluções não danificaram as superfícies e não foram notados sinais de oxidação. Os autores concluíram que as várias soluções testadas não tiveram efeitos nocivos sobre a superfície de liga de Co-Cr. Porém, Steradent apresentou a menor liberação iônica.

Papadiochou et al. (2018) realizaram uma revisão sistemática de evidências científicas recentes sobre as práticas de higiene das próteses removíveis em relação à eficácia, cor e estabilidade dimensional. Esta revisão também teve como objetivo identificar as atitudes e hábitos dos pacientes em relação à higiene das próteses. Três bases de dados eletrônicas (MEDLINE/PubMed, Scopus e Cochrane Library) foram rastreadas, em língua inglesa, entre janeiro de 1995 e dezembro de 2016. Ensaio clínicos controlados (ECCs) envolvendo pacientes sem sinais clínicos de estomatite protética, juntamente com um objetivo abrangente de avaliar a eficácia das intervenções de higiene e seu impacto na cor da prótese e na estabilidade dimensional, foram elegíveis para inclusão. Após uma triagem minuciosa de títulos/resumos/textos completos e consideração dos critérios de inclusão definidos, 21 ECCs examinaram a eficácia das abordagens de higiene, 3 avaliaram a estabilidade de cor de próteses submetidas a práticas de higiene, 2 examinaram a estabilidade dimensional de próteses após a desinfecção por micro-ondas e 30 estudos registraram as atitudes e hábitos dos pacientes em relação à higiene das próteses. Pode-se concluir que a aplicação combinada de diferentes intervenções de higiene, incluindo escovação ou vibração de ultrassom em conjunto com agentes químicos, leva a resultados mais eficazes (redução da porcentagem de biofilme da prótese e/ou número de unidades formadoras de colônias de microrganismos). A estabilidade dimensional pareceu estar inalterada, mas o número de ensaios clínicos foi limitado. Concentrações críticas de soluções de limpeza, juntamente com a duração de sua implementação, influenciam a manutenção das próteses em relação à estabilidade da cor. A escovação representa a prática de higiene mais comumente aplicada, enquanto as atitudes dos usuários de próteses dentárias não seguem as orientações recomendadas considerando a frequência relatada de práticas de higiene e o uso contínuo da prótese.

Varma et al. (2018) compararam dois dentifrícios à base de plantas (extrato de Meswak e óleo de melaleuca [TTO]) e analisaram sua eficiência na redução do acúmulo de biofilme. Um total de 25 pacientes foram examinados em termos de biofilme presente e receberam uma pontuação. Foram então aleatoriamente designados para usar dentifrício à base de Meswak ou à base de TTO. Após 24 h, um novo escore de biofilme foi registrado e os pacientes usaram o dentifrício que utilizavam habitualmente em suas rotinas de higienização por 2 semanas. Os pacientes foram então instruídos a usar o segundo dos dois dentifrícios do estudo por 24 horas, e um terceiro conjunto de escores de biofilme foi obtido. A análise dos escores mostrou redução no índice de biofilme após o uso de qualquer um dos dois dentifrícios à base de plantas; no entanto, quando comparado com o TTO, o à base de Meswak resultou em menor quantidade de biofilme. A escovação com dentifrício à base de Meswak apresentou queda significativa no escore de biofilme quando comparada com dentifrício à base de TTO.

Badaró et al. (2019b) compararam um dentifrício experimental de *Ricinus communis* com dentifrícios comerciais avaliando a atividade antibiofilme contra microrganismos presentes em bases de próteses. Seiscentos espécimes foram confeccionados e distribuídos em 5 grupos: água; dentifrício experimental; dentifrício específico para prótese (Dentu Creme) e dois dentifrícios convencionais (Colgate e Trihydral) contra os microrganismos *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. mutans*, *S. aureus* e *E. coli*. Todos os grupos foi realizado um controle negativo (sem contaminação) e positivo (com contaminação, mas sem limpeza). Foi feita a contaminação dos espécimes e foram incubados. Em seguida, foi realizada escovação manual (60 s), lavagem com PBS e depois os espécimes foram imersos em meio de cultura líquido, colocados em suspensão e semeadura em meio sólido. Os resultados (média de triplicatas) foram expressos em UFC/mL. O dentifrício específico foi o mais eficaz contra *S. mutans*, seguido pelos dentifrícios convencional (Trihydral e Colgate) e experimental, que foram semelhantes entre si. Todos eram diferentes da água. Os dentifrícios específicos e experimental foram semelhantes contra *S. aureus*, com maior média de UFC quando comparado ao convencional (Colgate), que foi mais eficiente. Para *C. albicans*, *C. glabrata* e *E. coli*, todos os dentifrícios foram semelhantes à água. Concluíram que o dentifrício experimental foi eficaz contra *S. aureus* e não contra *Candida spp.*, *S. mutans* e *E. coli*, como ocorreu com os dentifrícios comerciais.

Curylofo et al (2020) compararam o efeito de soluções de pastilhas efervescentes, cloreto de cetilpiridínio e soluções experimentais à base de *Ricinus communis* na superfície da liga de Co-Cr. Cinquenta e cinco espécimes circulares de Co-Cr foram confeccionados pelo método de fundição de cera perdida. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: 1) água deionizada (controle); 2) *R. communis* a 2%; 3) *R. communis* a 10%; 4) Pastilhas efervescentes 5) Cloreto de cetilpiridínio. A rugosidade superficial dos corpos de prova foi avaliada antes da imersão (linha de base), e em tempos simulados de ½, 1, 2, 3, 4 e 5 anos, por microscópio confocal a laser e perfilômetro. A topografia de superfície e composição química foram analisadas qualitativamente por MEV e EDS. Após as análises, diferença significativa foi encontrada no fator tempo, nas soluções *R. communis* a 2% e *R. communis* a 10% que propiciaram rugosidade decrescente com o passar do tempo (½, 2, 3 e 5 anos e 1 e 2 anos, respectivamente). Os autores concluíram que, embora tenha sido encontrada diferença significativa para a rugosidade, os resultados, abaixo de 0,2 µm, são clinicamente aceitáveis. Assim, todas as soluções podem ser usadas com segurança na limpeza de PPRs por um período de 5 anos.

Vasconcelos et al. (2020) analisaram a atividade antimicrobiana de pastilhas efervescentes nas superfícies de Co-Cr e resina termopolimerizável. 55 padrões circulares de cera (Ø 12 x 3 mm) foram obtidos, por meio de uma matriz metálica, e fundidos em liga de CoCr. Para resina acrílica, muflas foram preparadas a partir de padrões circulares de cera (Ø 20 x 5 mm). Os espécimes metálicos obtidos, foram posicionados na mufla e a resina acrílica despejada e prensada ao entorno deles, simulando a composição de uma prótese parcial removível. Foram esterilizados e contaminados com *Streptococcus mutans*, *Staphilococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*, compondo um biofilme multiespécie. Logo após, foram imersos de acordo com as instruções do fabricante em quatro soluções contendo pastilhas higienizadoras de prótese: Polident 3 Min (P3M), Polident for partials (PP), Corega Tabs (CT) e NitrAdine (Ni) e água destilada (controle positivo). Após a limpeza, microrganismos viáveis foram quantificados pela contagem do número de UFC. Houve redução significativa de *S. mutans* após imersão em Ni em comparação com CT e controle, enquanto grupos PP e P3M apresentaram ação intermediária. As pastilhas efervescentes não apresentaram ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *C.*

albicans e *C. glabrata*. Concluíram que Ni exibiu ação antimicrobiana moderada e que as demais pastilhas não promoveram redução do biofilme multiespécie.

AlHamdan et al. (2021) avaliaram o efeito de diferentes limpadores e terapia fotodinâmica (TFD) na desinfecção de próteses parciais removíveis (PPRs) confeccionadas com liga metálica de cobalto e cromo (Co-Cr). Vinte e cinco PPRs foram confeccionadas, divididas aleatoriamente em 5 grupos e foram colonizadas com *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. As estruturas das próteses foram imersas em 15 mL do clado feito com inóculo e meio de cultura. O grupo 1, as próteses foram higienizadas com derivado de hematoporfirina; grupo 2, com 0,12% de digluconato de clorexidina; o grupo 3, com enzima de perborato de sódio; e o grupo 4, com ácido cítrico. Através de um rugosímetro de superfície, a rugosidade superficial (Ra) da liga de Co-Cr e da resina acrílica, das próteses, foram medidas em 3 zonas diferentes de suas superfícies (μm) antes e após a desinfecção. Como resultados, o Ra da liga de Co-Cr não apresentou diferença significativa aos diferentes limpadores químicos e fotossensibilizante. Da mesma forma, o Ra da resina acrílica polimerizada não apresentou diferenças significativas. Analisando comparativamente os grupos que utilizaram derivado de hematoporfirina e digluconato de clorexidina 0,12%, ambos apresentaram propriedades de limpeza semelhantes, sendo eficazes contra *S. aureus*, *C. albicans* e *S. mutans*, se mostrando com alta atividade antimicrobiana. O digluconato de clorexidina 0,12% e o derivado de hematoporfirina demonstraram Ra mínimo na higienização das estruturas que compõe as PPRs.

Arruda et al. (2021) avaliaram os efeitos do hipoclorito de sódio 0,2%, Efferdent (Prestige Consumer Healthcare) e *Ricinus communis* 6,25% na remoção de biofilme e ação antimicrobiana em próteses e escovas usando protocolos de não imersão ou imersão para as escovas. Um total de 45 usuários de próteses dentárias foram aleatoriamente designados para um protocolo de imersão de prótese por 7 dias: solução salina 0,85% por 20 minutos (controle); hipoclorito de sódio 0,2% por 20 minutos (SH); Efferdent por 3 minutos; ou 6,25% de *R. communis* por 20 minutos (RC). Os participantes também foram randomizados para imersão ou não imersão de suas escovas com suas próteses nas mesmas soluções. Para avaliação do biofilme, as próteses foram coradas e fotografadas, e a área do biofilme foi medida usando Image Tool 3.0. Para avaliar a carga microbiana em próteses e escovas, o biofilme foi coletado e as colônias de *Candida spp* e *Streptococcus mutans* foram

contadas. Os grupos SH, Efferdent e RC apresentaram redução do biofilme de *Candida spp* nas próteses independentemente do protocolo de imersão das escovas. No entanto, não foi encontrada diferença nas contagens de *Candida spp* coletadas das escovas imersas em comparação com as escovas não imersas nas soluções. Os grupos SH e Efferdent propiciaram redução de *S. mutans* em ambas as próteses e escovas, exceto nos subgrupos sem imersão. Conclui-se que todas as soluções reduziram o biofilme e a carga microbiana da prótese. No entanto, a imersão das escovas nas soluções não contribuiu para a redução da carga microbiana.

Chang et al. (2021) avaliaram o efeito da associação da escova de dentes com o dentífrico na variação de peso e propriedades de superfície de diferentes bases de próteses. Foram utilizados 4 materiais de base de próteses: polimerização a quente convencional (PQC), alto impacto (AI), CAD/CAM e resinas de poliamida (RP). Foram submetidos 5 espécimes de cada grupo à abrasão da escovação (50.000 ciclos). O valor do peso, rugosidade da superfície e topografia de cada grupo foram determinados antes e após a escovação. A dureza foi medida pelo teste de dureza Vickers. Após a escovação, o peso da RP aumentou significativamente; perdas de peso significativas foram observadas para PQC e resinas de AI, mas nenhuma para a resina CAD/CAM. A rugosidade superficial de cada grupo aumentou significativamente devido ao desgaste causado pela escovação. A variação de peso e a rugosidade da superfície não foram afetadas pela dureza. Os resultados sugerem que os materiais de base de prótese se deterioram após a escovação com dentífrico, em que a RP exibiu menores níveis de abrasão.

Cinquanta et al. (2021) determinaram por meio de questionários, o nível de conhecimento e instrução de higiene de próteses de idosos italianos em seus domicílios e correlacionaram por meio de um estudo clínico, os hábitos de higiene relatados por esses pacientes e como estava a limpeza da prótese por exame clínico. No questionário realizado, continham questões sobre dados demográficos e os hábitos de higiene de cada paciente. No exame clínico, realizado por um mesmo profissional, foi realizado um exame intraoral e da prótese. Onde, a higienização avaliada de cada prótese foi classificada de acordo com sistema de pontuação de 3 pontos descrito por Hoad-Reddick et al. (1988): Pontuação 1 (prótese limpa; Pontuação 2 (prótese suja); Pontuação 3 (prótese extremamente suja). Para os

pacientes que faziam o uso de próteses maxilares e mandibulares, foi realizada uma média da pontuação de ambas para avaliar a limpeza. 161 voluntários participaram e responderam ao questionário: 92 mulheres (65-93 anos) e 69 homens (65-86 anos), sendo um total de 239 próteses consideradas para o estudo. Uma correlação pode ser criada, quanto mais velhos os participantes, mais velhas eram suas PPRs, tendo a limpeza reduzida. Ou seja, a correlação de quanto maior a faixa etária do paciente, pior o grau de limpeza das PPRs. Metade dos participantes (n=81; 50,3%) relataram retirar a prótese durante a noite'. A outra metade dos participantes relataram dormir com a prótese colocada. Alguns participantes do estudo (n=32; 19,9%) relataram que nunca receberam instruções sobre como higienizar suas próteses. A escovação mecânica, escova dental e dentífrico, foi o método de limpeza mais utilizado (n=47; 29,2%), enquanto a associação dos métodos (imersão e mecânico), recomendado, foi utilizado por 34 (21,1%) participantes do estudo. Um número semelhante (n=25; 15,5%) relatou pelo menos 1 episódio de estomatite relacionada à prótese. No estudo realizado, hábitos dos pacientes de higienização das suas próteses realizados em seus domicílios, resultaram em má limpeza das próteses. A maioria dos voluntários fizeram o uso de escova dental e dentífrico para higienização das suas próteses, apesar da associação do método mecânico com o químico ser relatado como método mais ideal.

Curylofo et al. (2021) avaliaram a aplicação de quitosana como agente de limpeza no controle da formação de biofilme em superfícies de ligas de Co-Cr e resinas acrílicas. 172 discos de Co-Cr e 172 discos de resina acrílica (14 mm x 3 mm) foram contaminados com *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ou *Candida glabrata* e incubados por 48 horas. Em seguida, os espécimes foram divididos aleatoriamente em grupos e imersos nas seguintes soluções por 15 minutos: solução sem quitosana (SQ; controle); solução de quitosana (Q; 5 mg/mL); solução de nanopartículas de quitosana (NQ; 3,8 mg/mL); e pastilha efervescente (PE). As taxas de recuperação do biofilme foram avaliadas pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). A morfologia do biofilme foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Para resina acrílica, PE apresentou o menor número de UFC para *S. aureus* e *S. mutans*. Q apresentou valores intermediários para *S. mutans*, *S. aureus* e *C. albicans*, e NQ apresentou valores intermediários para *S. mutans* e *S. aureus*. Para *C. glabrata*, não houve diferença estatística entre as soluções. Para o Co-Cr, o PE apresentou o maior nível

de ação antimicrobiana contra todos os microrganismos, e o Q apresentou um nível intermediário de ação contra *S. mutans* e *S. aureus*. Contra *C. albicans* e *C. glabrata*, não houve diferença significativa entre Q, NQ e SQ. Conclui-se que embora o PE tenha um espectro de ação antimicrobiano mais amplo, a solução de quitosana mostrou-se promissora como limpador de dentaduras.

Ojah et al. (2021) avaliaram a eficácia de triphala churna (TC - Dabur India), aloe vera, Neem (NE - Himalaya) e pastilha efervescente (PE - Clinsodent) contra *Candida* sp. em superfície de resina acrílica polimerizada a quente. Foram selecionados 40 pacientes que realizavam o uso de próteses dentárias e divididos em quatro grupos (n=10) para higienização de tal forma: Grupo I (PE), Grupo II (TC), Grupo III (AV) e Grupo IV (NE). Ambos foram armazenados em recipientes de cobre. Durante o estudo, os pacientes foram orientados a não utilizarem escovas de dente, pois comprometia o resultado clínico. Antes e após o protocolo de tratamento (16º dia), foram coletados swabs da superfície palatina das próteses. Os swabs, após coleta, foram cultivados em meio de ágar Sabouraud dextrose, incubada a 37°C por 48 h, e as contagens totais de *Candida* (UFC/4 cm²) foram determinadas. Após o protocolo de higienização, a contagem média de *Candida* foi mais baixa em PE, seguido por NE, TC e AV. AS PE apresentaram uma maior redução de *Candida*. Mas dentre os produtos naturais, NE obteve maior redução da contagem de fungos, seguido de TC e por último AV. Conclui-se que devido ao alto custo das PE, que são abundantemente utilizadas, a erva NE se torna uma alternativa.

Santos et al., (2021) analisaram em superfícies de resina acrílica a efetividade de dentifrícios à base de óleos essenciais de *Copaifera officinalis* (Copaíba), *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto), *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca), *Pinus strobus* (Pinheiro Branco) e *Ricinus communis* (Mamona), avaliando suas propriedades físico-químicas (pH, densidade, consistência, reologia, abrasividade, perda de peso e rugosidade superficial), características organolépticas ((aparência, cor, odor, sabor) e ação antimicrobiana (Poço de Difusão (PD) e antibiofilme (Unidades Formadoras de Colônias (UFC). contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* e biofilme multiespécie. As formulações dos dentifrícios experimentais a base de óleos essenciais foram comparadas com água destilada (AD – controle negativo) e um dentifrício comercial (Trihydral – controle positivo). De acordo com os resultados obtidos, as propriedades organolépticas e físico-químicas foram adequadas. Todos

os dentifrícios realizaram perda de peso, com destaque para os dentifrícios experimentais de Copaíba e Mamona e aumento de rugosidade superficial igual para todos. A ação antimicrobiana, para os dentifrícios Copaíba e Eucalipto apresentaram resultado semelhante ao Trihydral, sendo eficazes contra *S. mutans* e *C. albicans*. Nenhum dos dentifrícios experimentais se mostraram eficazes contra *S. aureus*. A ação antibiofilme, em biofilme multiespécie, não se mostrou eficaz para nenhum dos dentifrícios experimentais, tendo contagens de UFC mais altas que Trihydral para todos os microrganismos. Os dentifrícios experimentais apresentaram propriedades satisfatórias; e apesar de apresentarem ação antimicrobiana, não mostraram eficientes contra ação antibiofilme sobre biofilme multiespécie.

Schmutzler et al. (2021) realizaram uma revisão sistemática com objetivo de fornecer uma visão geral das evidências científicas disponíveis de estudos clínicos prospectivos sobre intervenções de higiene de próteses parciais removíveis (PPRs). Uma busca sistemática da literatura foi realizada de junho de 1975 a maio de 2020 e incluiu artigos publicados em inglês que foram indexados nos arquivos digitais do PubMed e Cochrane (incluindo PubMed, Embase, ICTRP, CT.gov) Os critérios de inclusão foram ensaios clínicos prospectivos com um mínimo de dez participantes, onde analisavam (1) abordagens e métodos para remoção de biofilmes formados na superfície de PPRs e (2) a influência desses biofilmes em materiais de base de prótese. A revisão sistemática através dos dados coletados indica que a higienização de próteses com a combinação de método mecânico (escovação) e métodos químicos para imersão geram uma maior e eficaz redução de biofilme que recobre as PPRs comparado a utilização desses métodos isolados.

Wiatrak et al. (2021) avaliaram o efeito de dentifrício contendo óleo essencial de tea tree natural (TTO) e extrato etanólico de própolis (EEP), na microflora e indicadores selecionados de saúde bucal em pacientes usuários de PPRs provisórias. Cinquenta pacientes com diferentes condições de higiene foram divididos em dois grupos. O grupo estudo recebeu o dentifrício com TTO e EEP, enquanto o grupo controle recebeu o mesmo dentifrício, mas sem TTO e EEP. Na primeira visita foi realizada higiene bucal e higienização das próteses. As visitas de controle ocorreram 7 e 28 dias depois e comparadas à linha de base. Índices como IPA (índice de placa aproximada), ISS-m (índice de sangramento de sulco modificado), IHO-s (índice de higiene oral simplificado) e IPP (índice de placa de prótese) foram avaliados em três etapas subsequentes e swabs foram coletados da

região do assoalho da boca para avaliação da microbiota. Após 7 e 28 dias de uso do dentifrício com TTO e EEP, observou-se diminuição significativa dos valores dos indicadores examinados no grupo de estudo em comparação com os valores na visita inicial. O número de cepas isoladas de microrganismos no grupo estudo diminuiu ou ficou mantido no mesmo nível, enquanto no grupo controle observou-se aumento no número de cepas isoladas. A estabilização observada da microbiota oral nos pacientes do grupo de estudo confirma a atividade benéfica do dentifrício contendo EEP e TTO em relação ao grupo controle.

Observando todas as análises aqui descritas e seus resultados, nota-se que ainda não foi encontrado um consenso entre os estudiosos acerca das soluções higienizadoras e suas ações antimicrobianas em superfícies metálicas de Co-Cr. Desta maneira, é necessário aprofundar os estudos sobre as ações dos higienizadores em superfícies metálicas de Co-Cr.

4. Material e Método

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Delineamento experimental

As variáveis quantitativas analisadas no estudo foram: contagem de UFC (UFC/mL) e percentuais de biofilmes vivo e total para análise da ação antibiofilme; rugosidade de superfície (μm) e alteração de brilho (ΔGU) para avaliação dos efeitos adversos da escovação com os dentífricos à base de óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Melaleuca alternifolia* e *Pinus strobus*.

4.1.1. Avaliação da ação antibiofilme

Para essa análise foi utilizado o fator de variação **Dentífricos**, em sete níveis: **1.** Controle (Grupo de espécimes metálicos que não foram escovados), **2.** Água destilada, **3.** Placebo, **4.** Trihydral, **5.** *Eucalyptus citriodora*, **6.** *Melaleuca alternifolia* e **7.** *Pinus strobus*. O experimento foi realizado em triplicata, em 3 momentos distintos. Para a contagem de UFC foram utilizados 9 espécimes para cada grupo experimental (n=9). Para avaliação da área recoberta por biofilme realizada por microscopia de fluorescência foram utilizados 2 espécimes para cada grupo (n=2).

Para testar a esterilidade do experimento, três espécimes por cada momento de realização do experimento foram utilizados (9 espécimes no total), e não receberam inoculação de microrganismos. Desta forma, foram confeccionados 86 espécimes de Co-Cr para avaliação da ação antibiofilme.

4.1.2. Avaliação dos efeitos adversos

4.1.2.1. Rugosidade de superfície e alteração de brilho

Tanto para a análise da rugosidade de superfície como da alteração de brilho, foram determinados os seguintes fatores de variação: **Dentífricos**, em seis níveis: **1.** Água destilada, **2.** Placebo, **3.** Trihydral, **4.** *Eucalyptus citriodora*, **5.** *Melaleuca alternifolia* e **6.** *Pinus strobus*. **Tempos**, em dois níveis: **1.** Inicial (T0); **2.** Após simulação de 5 anos (T1).

A amostra do experimento foi composta por 10 espécimes para cada grupo experimental (n=10). Desta forma, foram obtidos 60 espécimes metálicos de Co-Cr.

4.2. Confeção dos Corpos de Prova

Inicialmente, foram obtidos padrões de cera (GEO, Renfert GmbH, Hilzingen, Alemanha) circulares (12 mm de diâmetro x 4 mm de espessura) a partir de uma matriz de teflon, confeccionada na Oficina do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP (Figura 1). A cera foi liquefeita em plastificador elétrico (BRAVAC, São Paulo, SP, Brasil) com temperatura média de 80°C (Figura 2) e vertida com conta gotas no interior da matriz (Figura 3). Após solidificação da cera, com o auxílio de espátula número 24 (Schobell Industrial Ltda, Rio Claro, SP, Brasil) aquecida, os excessos foram removidos, de forma que o orifício ficasse totalmente preenchido ao nível do limite de sua espessura, sem excessos ou falhas de material (Figura 4). Para garantir a completa lisura da superfície, a espátula foi aquecida e utilizada sobre a superfície já acabada e nivelada. A fim de evitar deformação, após obtenção, o padrão de cera foi mantido em um recipiente plástico com água para posteriormente ser fundido.



Figura 1 - Matriz de teflon.



Figura 2 - Plastificador elétrico.



Figura 3 - Cera liquefeita sendo vertida com conta gotas no interior da matriz.



Figura 4 - Acabamento do disco de cera.

4.2.1. Inclusão dos padrões de cera

Canais de alimentação (Cerafix Manufaturada e Comércio de Ceras para Moldes Ltda, Pradópolis, SP, Brasil) foram adicionados aos discos de cera, para confeccionar uma haste (Figura 5). Na base formadora do cadinho foram posicionados quatro discos em uma trave confeccionada de *sprue* de cera de 5 mm (Kota Indústria e Comércio Ltda. – EPP, São Paulo, SP, Brasil), de forma equidistante para posterior aplicação do agente antibolhas (Silikon & Wachs, Entspannen, Alemanha) (Figuras 6 e 7).



Figura 5 - Discos de cera com pequena haste de canais de alimentação.



Figura 6 - Posicionamento dos discos de cera na base do anel de fundição.



Figura 7 - Discos de cera posicionados no anel de fundição.

Os padrões de cera foram incluídos em revestimento fosfatado Micro Fine 1700 (Talladium do Brasil, Curitiba, PR, Brasil), manipulado na proporção de 180 g de pó, 36 mL de líquido e 10 mL de água destiladas. O revestimento foi manipulado a vácuo (Espatuladora A300, Polidental, Cotia, SP, Brasil) por 60 segundos e foram aguardados 30 minutos até sua presa final.

Os anéis foram levados para expansão do revestimento e eliminação da cera no forno Edgcon 3P (EDG, São Carlos, SP, Brasil), (Figura 8). O ciclo de aquecimento dos moldes foi realizado da seguinte maneira: aquecimento à velocidade de 15°C/min da temperatura ambiente até 300 °C, permanecendo nesta temperatura por trinta minutos, aquecimento de 15 °C/min até 950 °C, permanecendo nesta temperatura por vinte minutos; resfriamento de 15 °C/min até 900 °C, permanecendo nesta temperatura por 60 minutos.

4.2.2. Fundição dos Discos Metálicos



Figura 8 - Forno usado para expansão do revestimento e eliminação da cera.

A fundição foi realizada em máquina eletrônica Neutrodyn Easyti (F.Lli Manfredi, Torino, Itália) (Figura 9), lotada no laboratório de Pesquisa em Fundição Odontológica do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP, por eletroindução a vácuo, padronizada e à temperatura de 1380 °C e torque constante de centrífuga. Três lingotes da liga metálica de Co-Cr (Degudent GmbH, Hanau, Alemanha) foram necessários para fundição e injeção em cada molde (Figura 10).



Figura 9 - Máquina eletrônica por eletroindução a vácuo.



Figura 10 - Lingotes de Co-Cr posicionados para fundição.

Após resfriamento, as fundições foram desincluídas e jateadas com óxido de alumínio de granulação de 100 μm (Aluminum Oxide 100; Asfer Chemical Industry, São Caetano do Sul, Brasil) sob pressão de 3 bar, por 5 segundos, no Microjet III (EDG, São Carlos, Brasil), para remoção dos excessos de revestimento. Foi realizada a separação dos espécimes dos canais de alimentação com auxílio de discos de carborundum e, então, submetidos ao acabamento e polimento (Figura 11).



Figura 11 - Espécimes após fundição e separação dos canais de alimentação.

4.2.3. Acabamento e Polimento

Com o auxílio de disco de carborundum e fresas metálicas, foi realizado o acabamento na superfície lateral do corpo de prova.

O acabamento e polimento das superfícies opostas dos espécimes metálicos foram realizados por meio de politriz AROPOL-E (Arotec, Cotia, SP, Brasil), situada no laboratório Multiusuário do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP, e lixas de granulação 220, 400, 600 e 1200 *mesh* (Norton Abrasivos Brasil, Saint-Gobain, França), a 999 rotações por minuto (rpm) (Figura 12). Cada espécime foi polido em ambas as superfícies, sendo que a cada 30 segundos uma rotação de 90° foi feita na superfície polida para a padronização do polimento. Os discos receberam carga axial manualmente, assim como irrigação com água corrente, durante toda a ação das lixas.



Figura 12 - Politriz com lixa adaptada.

Para padronização das superfícies, em relação à lixa 220, os discos estiveram sob sua ação até que as superfícies ficassem totalmente uniformes, obtendo-se um padrão homogêneo. Ao mudar de lixa, o espécime foi posicionado a 90° da posição utilizada na lixa anterior, e o polimento foi realizado até que as marcas da lixa anterior não fossem mais identificadas. Após o uso de cada lixa, os espécimes metálicos foram lavados individualmente em água corrente a fim de remover qualquer partícula de metal ou grânulos remanescentes das lixas utilizadas. Após isso, todos os discos foram limpos com gaze e álcool isopropílico para limpeza de resíduos e oleosidade. Todas as superfícies foram polidas (Figura 13), respeitando um intervalo de rugosidade de 0,03 μm a 0,08 μm , considerado dentro do limite clinicamente aceitável (Quirynen et al., 1995; Bollen et al., 1997), obtido com rugosímetro de superfície (Surftest SJ-301, Mitutoyo Corporation, Japão).



Figura 13 - Espécime metálico após polimento.

Os espécimes metálicos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: I) espécimes destinados à avaliação da ação antibiofilme (n=86) e II) espécimes destinados à avaliação dos efeitos adversos (n=60). Os espécimes do grupo I foram embalados em envelopes de papel grau cirúrgico (Envelope Grau Cirúrgico Termo Selável, Sispack, SP, Brasil), selados e submetidos à esterilização em autoclave. Os espécimes do grupo II foram envoltos em algodão e embalados individualmente em envelopes plásticos para não apresentarem qualquer tipo de alteração em sua superfície.

4.3. Cepas microbianas

Quatro cepas foram utilizadas para contaminação dos espécimes metálicos compondo um biofilme multiespécie. Os microrganismos selecionados apresentam alta prevalência em usuários de próteses dentárias (Nikawa et al., 1998; Crosset al., 2004). Segue abaixo, as cepas microbianas que foram utilizadas:

- 1 – *Streptococcus mutans* – ATCC 25175 (Cocos gram-positivo);
- 2 – *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923 (Cocos gram-positivo);
- 3 – *Candida albicans* – ATCC 10231 (Levedura);
- 4 – *Candida glabrata* – ATCC 2001 (Levedura).

O preparo do inóculo microbiano e as semeaduras ocorreram com meios de cultura específicos para cada cepa microbiana.

4.4. Formulação dos dentifrícios

Os dentifrícios foram formulados de acordo com Normatização para qualidade e eficácia de dentifrícios (Brasil, 1989) observando-se técnicas de desinfecção e antissepsia (Brasil-ANVISA, 2000), seguindo metodologia prévia (Paranhos et al., 2000 a,b; Panzeri et al., 2009; Santos et al., 2021), tendo, como agentes antimicrobianos, óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto), *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) e *Pinus strobus* (Pinheiro Branco) com concentração de 0,5%. Tais óleos foram selecionados por apresentarem ação antimicrobiana (Addy, 2005; Smolarek et al., 2015; Santos et al., 2021).

Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *M. alternifolia* foram doados pela Cunha RAS (Sítio das Melaleucas, Ibiúna, São Paulo, Brasil) e o de *P. strobus* foi adquirido no Mundo dos Óleos Ltda (Brasília, Distrito Federal, Brasil). Os componentes básicos utilizados na formulação estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição básica dos dentifrícios (Santos et al., 2021).

Componentes	Fabricante	Função
Hidroxietilcelulose	Fagron Rubber Industry Products Ltda, Guarulhos, SB, Brasil	Espessante
Glicerina	Ely Martins, Ribeirão Preto, SP, Brasil	Umectante
EDTA	Fagron Rubber Industry Products Ltda, Guarulhos, SB, Brasil	Quelante
Benzoato de Sódio	Labsynth Ltda, Diadema, São Paulo, SP, Brasil	Conservante
Cocamidopropil betaina	Fagron Produtos para Indústria de Borracha Ltda, Guarulhos, SB, Brasil	Surfactante
Óleo essencial*	-	Antimicrobiano ativo
Sílica (Tisoxil 73)	Rhodia Solvay Group, São Paulo SP, Brasil	Abrasivo
Sílica (Tisoxil 43 B)	Rhodia Solvay Group, São Paulo SP, Brasil	Espessante
Dióxido de titânio	Fagron Produtos para Indústria de Borracha Ltda, Guarulhos, SB, Brasil	Pigmento (branco)
Aroma Mentol	Givaudan do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil	Aromatizante
Água destilada	-	Veículo

**E. citriodora* (Eucalipto), *M. alternifolia* (Melaleuca) e *P. strobus* (Pinheiro Branco)

O dentifrício utilizado como placebo seguiu as mesmas especificações, no entanto, em sua composição não apresentava os óleos essenciais, o agente antimicrobiano ativo, somente os demais componentes presentes na Tabela 1.

Segundo metodologia prévia (Santos et al., 2021), os diferentes componentes foram pesados em balança digital (AS5500C, Marte Científica e

Instrumentação Industrial Ltda, São Paulo, SP, Brasil). A primeira fase relacionou-se ao preparo de um gel. Para a obtenção de 100 g de dentifrício foram utilizados 41,7 mL de água destilada. Em seguida, foi incorporado o espessante, sob agitação constante em chapa de aquecimento (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) até a formação do gel. Em seguida, o umectante foi adicionado na amostra ainda aquecida. Após o resfriamento do gel, o óleo essencial e os demais componentes (conservante, quelante, corante, tensoativo, abrasivo e flavorizante) foram adicionados de forma gradativa e homogêneos em um misturador a vácuo (Turbomix, EDG Equipamentos e Controles Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) de forma a evitar a formação de espuma e bolhas e obter uma mistura homogênea (Santos et al., 2021).

Foi adicionado também hidroxietilcelulose como espessante, por apresentar propriedades coloidais e garantir o aspecto de gel do produto. Adicionalmente foi realizada associação com a sílica (Tisoxil 43 B) visando melhor ação tixotrópica do produto. Como quelante, foi selecionado o EDTA, por sua capacidade de formar complexos estáveis com diversos íons presentes na formulação. A inclusão de um detergente (componente tensoativo) foi realizada com o intuito de favorecer a remoção de resíduos e do biofilme protético, sendo selecionada a cocoamidopropil betaina por ser um agente anfotérico e apresentar comportamento como ácido ou como base, dependendo dos outros reagentes presentes na formulação, além de agir como agente espumante (Santos et al., 2021).

Com a finalidade de promover baixa abrasividade, foi selecionado um abrasivo suave (sílica Tixosil 73), substância na forma de pó insolúvel, com características de desgaste por fricção, o qual teve a função de auxiliar a promoção de limpeza, além de favorecer o polimento e evitar a formação de manchas na prótese dentária (Santos et al., 2021).

A glicerina foi selecionada como umectante, a fim de evitar o ressecamento e o dióxido de titânio, como corante (branco), para promover melhora da qualidade visual do produto. Foi utilizado o aromatizante (mentol), agente de sabor e aroma, para promover uma experiência agradável de uso do produto. Por último, como conservante, foi selecionado o benzoato de sódio, com o objetivo de garantir a durabilidade do produto durante um período de 2 anos (Santos et al., 2021).

Os dentifrícios foram armazenados em bisnagas brancas esmaltadas de alumínio (GP Pharma Comércio de Embalagens Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) com capacidade para 100 g (Figura 14).

4.5. Análise da ação antibiofilme



Figura 14 - Bisnaga com dentifrício.

Foi realizada avaliação da ação antibiofilme dos dentifrícios, de acordo com metodologia prévia (Santos et al., 2021) em relação ao biofilme multiespécie composto por *S. mutans*, *S. aureus*, *C. albicans* e *C. glabrata* (Curylofo et al., 2021). A avaliação foi feita por meio do método da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e da análise da área recoberta por biofilme (microscopia de fluorescência).

4.5.1. Obtenção do inóculo

Após o descongelamento e crescimento dos microrganismos por 48 horas em seus meios de cultura sólidos [*S. mutans* e *S. aureus*: Agar *Brain Heart Infusion* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, Índia); *C. albicans* e *C. glabrata*: Agar Sabouraud Dextrose (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda)], e consequente reativação, uma colônia foi transferida ao seu respectivo caldo [*S. mutans* e *S. aureus*: Caldo *Brain Heart Infusion* (HiMedia); *C. albicans* e *C. glabrata*: Caldo Sabouraud Dextrose (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda)], que permaneceu incubado a 37 °C por 24 horas de forma a obter células em fase exponencial de crescimento. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 4200 g por 5 minutos (Figura 15). O *pellet* resultante

foi lavado duas vezes em *Phosphate Buffered Saline* (PBS). A concentração das bactérias por mL foi avaliada segundo a turvação da suspensão verificada em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific Multiskan Spectrum, MA, EUA), em comprimento de onda de 625 nm (Figura 16). Foi realizada previamente calibração com 1 mL de PBS esterilizado, em recipiente específico para análise esterilizado, para obter a absorbância zero. A análise foi realizada novamente, com os microrganismos diluídos em PBS esterilizado. Os valores foram confirmados por meio de semeadura em placa de Petri.



Figura 15 - Centrífuga.

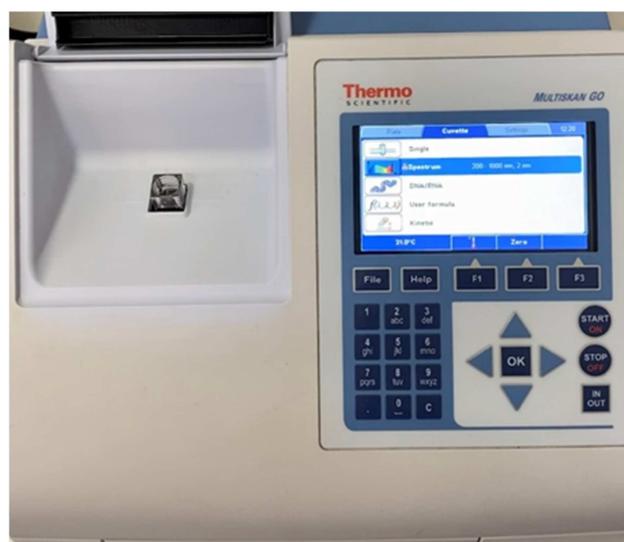


Figura 16 - Espectrofotômetro.

A contagem da concentração celular das leveduras foi feita na câmara de Neubauer (Kasvi Importação E Distribuição de Produtos Para Laboratórios Ltda, Curitiba, PR, Brasil) para maior precisão, devido à morfologia variável do gênero.

A câmara de Neubauer é composta por uma lâmina de vidro grossa para uso em microscópio óptico, dividida em quadrantes. Cada quadrante é dividido perpendicularmente por linhas que formam a câmara, sendo assim, destinado à contagem de células, por unidade de volume de uma suspensão. No quadrante que possui a maior divisão, é realizada a contagem das células maiores (leveduras). O volume de cada quadrante é de 0,0001 mL, tornando viável a contagem de células. Foram utilizados 10 µL de suspensão de levedura e foram e foi calculada a concentração de microrganismos com a fórmula $N = C/4 \times 10^6 \times D$ UFC/mL, onde N é igual ao número total de UFC/mL, C é igual a contagem de leveduras nos quadrantes em questão e D é igual a diluição utilizada. Os valores obtidos na contagem foram confirmados por semeadura em placa de Petri.

4.5.2. Contaminação dos espécimes e formação do biofilme

Todo o teste foi realizado em triplicata, em 3 momentos distintos. Assepticamente, em câmara de fluxo laminar, 3 corpos de prova de cada grupo foram distribuídos aleatoriamente em placas de cultura celular de 24 poços (Techno Plastic Products- TPP, Trasadingen, Cantão Schaffhausen, Suíça). Cada poço recebeu 1,5 mL de Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Kasvi) inoculado com os microrganismos (leveduras: 10^6 UFC/mL; bactérias: 10^7 UFC/mL) com exceção do grupo controle negativo, o qual recebeu meio de cultura estéril. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e 30 minutos sob agitação de 75 rpm (Incubadora Shaker, CE-320 Cienlab – Equipamentos Científicos, Campinas, SP, Brasil) em microaerofilia para aderência dos microrganismos aos espécimes. Após esse período, cada espécime e poço foram lavados duas vezes com PBS estéril para a remoção dos microrganismos não aderidos.

Na sequência, 1,5 mL de BHIB estéril foram novamente inseridos em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 75 rpm por 24 horas em microaerofilia e metade do meio foi substituído por BHIB novo para fornecimento de nutrientes ao biofilme. As placas foram incubadas por mais 24 horas para a maturação do biofilme. Essas etapas foram realizadas três vezes para permitir a contaminação de 9 espécimes para cada grupo. Três espécimes foram mantidos

sem inóculo a fim de assegurar a assepsia de todas as etapas laboratoriais (controle negativo). Após esse período, os espécimes foram submetidos à higienização por escovação. Assim, os 63 espécimes para a determinação da quantidade de microrganismos viáveis após escovação (UFC) foram distribuídos (n=9) nos 7 grupos já mencionados e os 14 espécimes para avaliação da capacidade de remoção do biofilme (microscopia de fluorescência) foram também distribuídos (n=2) nos 7 grupos.

4.5.3. Procedimento de Escovação

O procedimento de escovação foi realizado manualmente ((Badaró et al. (2019) no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP.

Placas de resina acrílica rosa foram confeccionadas, com três cavidades circulares (12 mm x 4 mm) e uma outra com três orifícios de dimensões menores para acomodação dos espécimes metálicos, para o procedimento de escovação (Figura 17). Foram esterilizadas em micro-ondas (Consul Facilite, Manaus, AM, Brasil) a 650 W, na potência 8 por 6 minutos (Coimbra et al., 2021) e receberam um corpo de prova contaminado por vez em uma das cavidades. Após isto, o conjunto foi submetido ao protocolo de escovação.

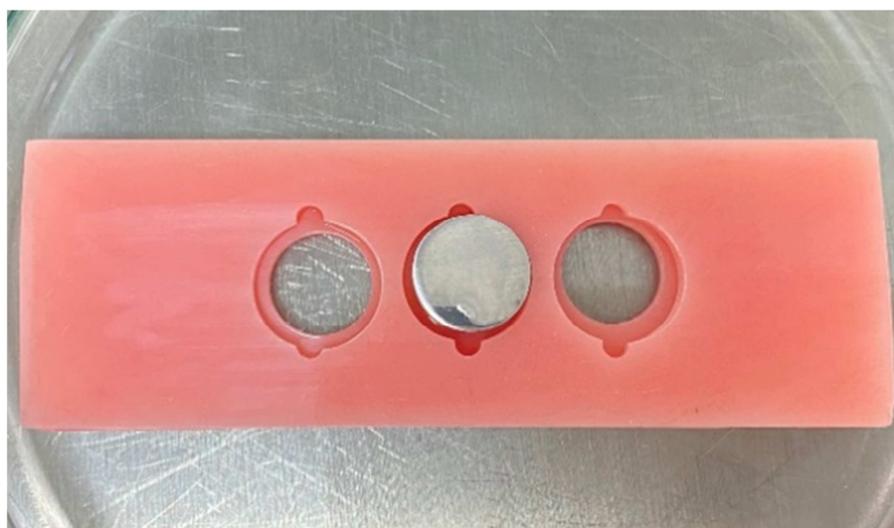


Figura 17 - Conjunto placa e espécime metálico.

Foram utilizadas 66 escovas dentais macias (CS 1560 Soft, Curaprox, São Caetano do Sul, SP, Brasil) para a escovação (Figura 18), sendo uma para cada espécime. Previamente à escovação, foi preparada uma suspensão de dentífricio e água destilada (proporção 1:1), utilizando-se 2 g de dentífricio e 2 mL de água destilada. O dentífricio foi pesado em balança eletrônica de precisão (Micronal S/A, São Paulo, SP, Brasil) e a água destilada foi inserida por meio de uma pipeta automática. A suspensão foi completamente homogeneizada com auxílio de um agitador vórtex dentro de um frasco de plástico com tampa esterilizado (Figura 19).



Figura 18 - Escovas dentais.



Figura 19 - Suspensão de dentífricio.

Sobre cada face do espécime foram colocados 100 μ L da suspensão para a escovação (Figura 20), que foi realizada em um espécime por vez, manualmente por um mesmo operador por 20 segundos em cada lado das superfícies opostas do espécime (Figura 21) para a determinação da quantidade de microrganismos viáveis após escovação e para avaliação da capacidade de remoção do biofilme.

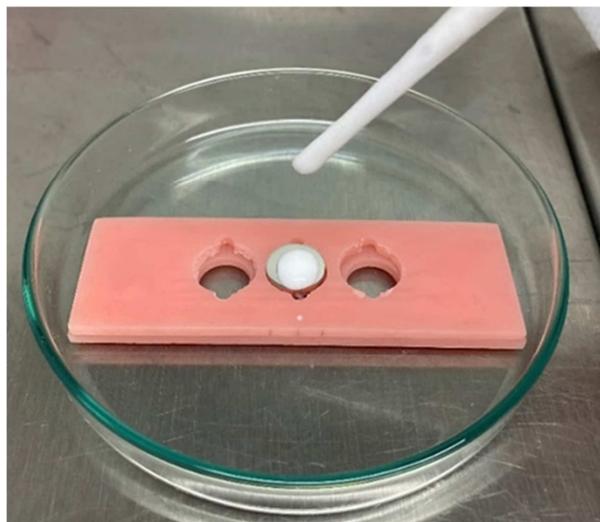


Figura 20 - Colocação do Dentifrício sobre o espécime metálico.

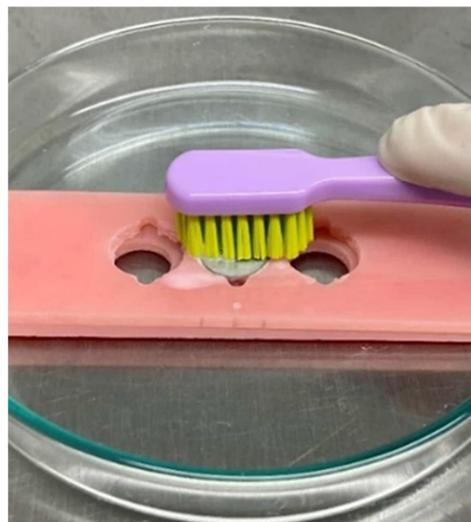


Figura 21 - Escovação de um espécime metálico.

Após a escovação, os espécimes foram removidos da placa de resina com auxílio de uma pinça estéril e enxaguados 5 vezes em PBS, com o intuito de remover o resíduo do dentifrício. Após enxágue seriado, para contagem de UFC, cada espécime foi inserido em um tubo de plástico com tampa de 50 mL, devidamente identificado, contendo 10 mL de meio Lethen Broth (LB) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai, MH, Índia). Os espécimes do grupo sem escovação foram retirados da placa de cultura celular e foram transferidos diretamente para os tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura LB.

4.5.4. Determinação da quantidade de microrganismos viáveis após escovação

Após a escovação, foi feita a determinação do número de microrganismos viáveis. O conjunto tubo de ensaio/espécime foi levado a uma cuba de ultrassom de 40 KHz, a 200 W (Altsonic, Clean 9CA, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20 minutos para o desprendimento dos microrganismos que não foram removidos pela escovação. Meios de cultura específicos foram utilizados para a semeadura da suspensão obtida em placa de Petri, visando a contagem das UFC dos microrganismos, isoladamente. Sendo assim, foram empregados os seguintes meios de cultura seletivos: I) CHROMagar Candida (*Candida* spp.) (BD Difco, Sparks, Maryland, Estados Unidos); II) agar manitol salgado (Kasvi) suplementado com 200 U/mL de nistatina (*S. aureus*); III) agar Mitis Salivarius (Kasvi) suplementado com 200 U/mL de nistatina, 20% de sacarose (*S. mutans*) e 4 mg/L de bacitracina (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA). Para a diluição seriada da suspensão, os tubos

foram agitados, individualmente, em agitador de tubos de ensaio (Phoenix, AP 56, Araraquara, São Paulo, Brasil) e diluídos em alíquotas de PBS. Uma alíquota da suspensão concentrada e uma de cada diluição (10^{-1} a 10^{-3}) foi semeada em placa de Petri sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 48 horas em estufa microbiológica. Os espécimes referentes ao grupo controle negativo foram semeados em todos os meios de cultura anteriormente citados.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem, por meio de uma lupa microscópica (Mod. SQZ-DS4, Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil). Para o cálculo das UFC/mL foi considerada a diluição em que a contagem variou de 1 a 300 colônias e foi utilizada a seguinte fórmula: $UFC/mL = C \cdot 10^n / q$, onde C equivale à contagem, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3) e q equivale à quantidade em mL, pipetada para cada diluição nas semeaduras das placas. O resultado obtido ao final foi transformado em \log_{10} .

Os tubos de ensaio contendo os espécimes foram incubados a 37°C por um período de 14 dias em estufa microbiológica. A turvação do meio de cultura foi avaliada e comparada a presença ou ausência do crescimento de microrganismos nas placas semeadas, onde a turvação serviu como indicativo de crescimento microbiano.

4.6. Análise da capacidade de remoção do biofilme

A quantidade de biofilme remanescente, após o protocolo de escovação, foi avaliada com o kit Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Após o protocolo de escovação descrito anteriormente, os espécimes (n=2) (Paranhos et al., 2019) foram transferidos aleatoriamente a uma nova placa de cultura de 24 poços. Em seguida, sobre a superfície de cada espécime, foram adicionados 1,5 mL da mistura dos corantes Syto 9 e Iodeto de Propídeo diluídos de acordo com a recomendação do fabricante. Os espécimes foram incubados em ambiente protegido de luz e à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, foram lavados em 1,5 mL de PBS, por 1 minuto, e observados em Microscópio de Fluorescência (Axioskop II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) (Figura 22), lotado no Laboratório de Reabilitação Oral do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP. Foram avaliados 10 campos para cada espécime (n=2), sendo duas imagens

para cada campo observado (01 verde e 01 vermelho), totalizando, 40 imagens de cada situação experimental.

A quantificação da área recoberta por biofilme foi realizada a partir do cálculo do número de pixels das regiões coradas em verde e vermelho por meio do software NIS – Elements (Nikon Instruments Inc., Nova York, USA). A capacidade de remoção do biofilme foi expressa em percentuais de biofilme total e de células vivas após a aplicação dos dentifrícios.



Figura 22 - Microscópio de Fluorescência.

4.7. Ensaio de escovação para análise de efeitos adversos

O ensaio de escovação foi realizado na máquina de escovação MEv063 (biopdi, São Carlos, São Paulo, Brasil), situada no laboratório de Estudos Biomecânicos em Prótese e Implantes do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP, de acordo com a ISO/DTS 145692 (Richmond et al., 2004) (Figura 23).



Figura 23 - Máquina de Escovação.

Seguindo a metodologia descrita por Santos et al. (2021), foram utilizadas 30 escovas dentais de cerdas macias (CS 1560 Soft, Curaprox, São Caetano do Sul, SP, Brasil), sendo uma escova para cada dois espécimes. Os cabos das escovas foram cortados para o encaixe do cabo nas sapatas da máquina de escovação (Figuras 24 e 25).



Figura 24 - Escovas Dentais com cabos cortados.



Figura 25 - Escova com cabo encaixado na sapata.

O procedimento de escovação foi realizado com a escova percorrendo horizontalmente toda a superfície dos dois espécimes, com frequência de 356 rpm e peso de 200 g (Figura 26). Uma bisnaga de cada dentifrício foi suspensa em água destilada (proporção 1:1) e 30 mL da suspensão foram vertidos nas cubas do aparelho sobre os espécimes (Figura 27).



Figura 26 - Escovação na máquina.



Figura 27 - Escovas dentais posicionadas e cubas com a suspensão de dentífrício e água destilada.

O tempo de escovação foi de 250 minutos (3 escovações diárias/ 2 minutos cada/ 89000 ciclos / 356 rpm) correspondentes a cinco anos de exposição à escovação por um indivíduo saudável (Freitas et al., 2006; Pisani et al., 2010).

4.8. Avaliação da rugosidade de superfície

A rugosidade de superfície (μm) dos corpos de prova foi avaliada pelo cálculo das leituras, antes do procedimento de escovação (R1) e após o procedimento (R2), com auxílio de um rugosímetro de superfície (Surftest SJ-301; Mitutoyo Corporation, Tóquio, Japão) (Figura 28), situado no laboratório de Metrologia do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP.



Figura 28 - Rugosímetro de superfície.

Para cada espécime foram realizadas três leituras de 4,0 mm de comprimento, com posterior obtenção das médias dessas leituras e com velocidade de 0,5 mm/s nas regiões correspondentes às demarcações aleatórias realizadas com caneta permanente dos espécimes, para que tanto as leituras iniciais como finais fossem realizadas em locais semelhantes antes e após a escovação (Figura 29).



Figura 29 - Leituras realizadas nas regiões correspondentes às demarcações.

4.9. Avaliação da alteração de brilho

Para análise qualitativa da alteração de brilho (ΔGU) na liga metálica de Co-Cr os espécimes foram avaliados em espectrofotômetro (Delta Vista 450G, Delta Color Indústria e Comércio de Equipamentos Eletrônicos Ltda, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil) (Figura 30), situado no laboratório de Estudos Biomecânicos em Prótese e Implantes do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP. Para cada espécime foram realizadas três leituras. Para tanto, foi confeccionada uma matriz de acrílico para posicionamento dos espécimes sempre no mesmo local (Figura 31). Após o ensaio de escovação, simulando 5 anos de uso, foi realizada novamente a análise no espectrofotômetro para cálculo do ΔGU .



Figura 30 - Espectrofotômetro.

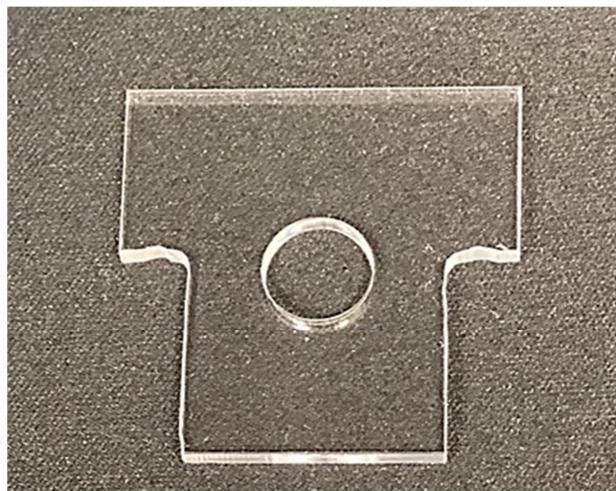


Figura 31 - Matriz de acrílico.

4.10. Análise estatística

Foi utilizado o programa R versão 3.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing). Os dados foram testados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que não apresentaram distribuição normal foi utilizado nparLD seguido de Friedman-Conover com ajuste Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) para os dados relativos à capacidade de remoção do biofilme e Kruskal-Wallis seguido de Dunn com ajuste de Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) para os dados referentes às outras análises. Foi adotado nível de significância de 5%.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Análise da ação antibiofilme

De acordo com os resultados obtidos em relação à contagem de UFC dos microrganismos avaliados (Tabela 2), para *S. mutans*, os grupos Eucalipto ($p=0,003$), Água destilada ($p=0,002$), Trihydral ($p<0,001$), Placebo ($p<0,001$), Pinheiro Branco ($p<0,001$), e Melaleuca ($p<0,001$), quando comparados ao Controle, promoveram maior redução do número de UFC.

Para *S. aureus*, os grupos Placebo ($p=0,002$), Pinheiro Branco ($p=0,001$), Melaleuca ($p<0,001$), Eucalipto ($p<0,001$) e Trihydral ($p<0,001$) reduziram o número de UFC quando comparados ao Controle e o grupo Trihydral ($p=0,002$) apresentou maior redução de UFC quando comparado à Água Destilada.

Para *C. albicans*, os grupos Água destilada ($p=0,003$), Pinheiro Branco ($p=0,003$), Placebo ($p=0,001$), Melaleuca ($p<0,001$), Eucalipto ($p<0,001$) e Trihydral ($p<0,001$), apresentaram resultados semelhantes e promoveram maior redução do número de UFC, quando comparados ao Controle.

Para *C. glabrata*, os grupos Água destilada ($p<0,001$), Placebo ($p<0,001$), Melaleuca ($p<0,001$), Pinheiro Branco ($p<0,001$), Eucalipto ($p<0,001$) e Trihydral ($p<0,001$) apresentaram resultados semelhantes, tendo promovido maior redução de UFC em relação ao Controle.

Tabela 2 - UFC/mL, em $\log_{10}^{(\text{UFC}+1)}$ – Média (desvio padrão) e mediana (intervalo de confiança) relativos aos microrganismos *S. mutans*, *S. aureus*, *C. albicans* e *C. glabrata*.

Microrganismo	Grupo	Média ± DP (Mediana)	95% IC (mínimo; máximo)
<i>S. mutans</i>	Controle	4,90 ± 1,69 (3,94) ^a	3,59; 6,20 (3,45; 7,58)
	Água Destilada	1,33 ± 1,03 (1,91) ^b	0,54; 2,12 (0,00; 2,45)
	Trihydral	0,88 ± 1,33 (0,00) ^b	-0,14; 1,91 (0,00; 2,81)
	Placebo	0,87 ± 1,04 (0,00) ^b	0,07; 1,67 (0,00; 2,21)
	Eucalipto	1,51 ± 0,92 (1,61) ^b	0,80; 2,22 (0,00; 2,51)
	Melaleuca	0,47 ± 0,93 (0,00) ^b	-0,25; 1,19 (0,00; 2,30)
	Pinheiro Branco	0,78 ± 1,22 (0,00) ^b	-0,15; 1,72 (0,00; 2,83)
<i>S. aureus</i>	Controle	7,12 ± 0,29 (6,94) ^a	6,90; 7,34 (6,78; 7,56)
	Água Destilada	5,46 ± 0,48 (5,28) ^{ab}	5,10; 5,83 (4,80; 6,17)
	Trihydral	4,17 ± 0,74 (3,91) ^c	3,60; 4,73 (3,63; 6,07)
	Placebo	4,87 ± 0,69 (4,73) ^{bc}	4,34; 5,40 (4,00; 5,73)
	Eucalipto	4,55 ± 0,50 (4,75) ^{bc}	4,17; 4,93 (3,58; 5,03)
	Melaleuca	4,59 ± 0,90 (4,78) ^{bc}	3,90; 5,28 (3,28; 6,20)
	Pinheiro Branco	4,76 ± 0,48 (4,78) ^{bc}	4,39; 5,13 (3,88; 5,52)
<i>C. albicans</i>	Controle	4,57 ± 0,52 (4,70) ^a	4,17; 4,97 (3,45; 5,25)
	Água Destilada	1,51 ± 1,47 (2,08) ^b	0,38; 2,64 (0,00; 3,24)
	Trihydral	0,79 ± 1,31 (0,00) ^b	-0,21; 1,80 (0,00; 3,62)
	Placebo	1,32 ± 1,05 (1,61) ^b	0,51; 2,13 (0,00; 2,60)
	Eucalipto	0,92 ± 1,09 (0,00) ^b	0,08; 1,76 (0,00; 2,21)
	Melaleuca	1,26 ± 1,47 (1,61) ^b	0,13; 2,39 (0,00; 4,41)
	Pinheiro Branco	1,59 ± 1,29 (1,91) ^b	0,59; 2,58 (0,00; 3,43)
<i>C. glabrata</i>	Controle	4,36 ± 0,33 (4,31) ^a	4,11; 4,62 (3,72; 4,78)
	Água Destilada	0,78 ± 1,19 (0,00) ^b	-0,13; 1,69 (0,00; 2,78)
	Trihydral	0,65 ± 1,02 (0,00) ^b	-0,13; 1,44 (0,00; 2,64)
	Placebo	0,64 ± 0,95 (0,00) ^b	-0,10; 1,37 (0,00; 1,91)
	Eucalipto	0,39 ± 0,78 (0,00) ^b	-0,21; 0,99 (0,00; 1,91)
	Melaleuca	0,60 ± 1,25 (0,00) ^b	-0,36; 1,56 (0,00; 3,48)
	Pinheiro Branco	0,50 ± 1,00 (0,00) ^b	-0,27; 1,26 (0,00; 2,56)

^{ab} letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre os grupos para cada micro-organismo. Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn com ajuste de Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR).

Nas Figuras 32 a 34 visualizam-se placas de Petri com crescimento das colônias microbianas do biofilme misto, obtidas para leitura e cálculo das UFC/mL.

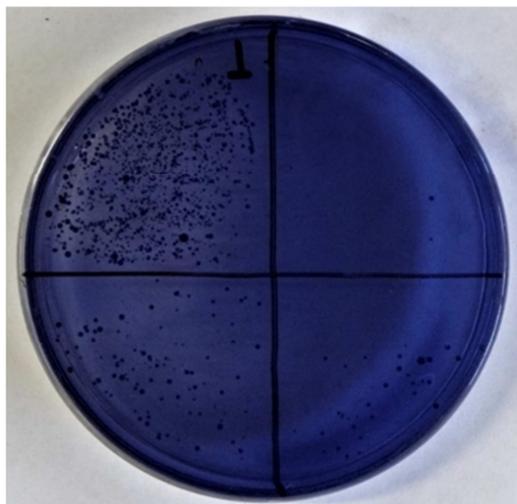


Figura 32 - Crescimento de *S. aureus* em meio de cultura Manitol Salt Agar.



Figura 33 - Crescimento de *S. mutans* em meio de cultura Mitis Salivarius Agar Base.

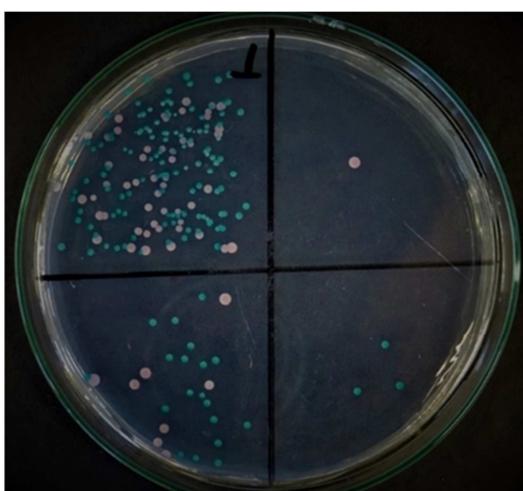


Figura 34 - Crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata* em meio de cultura CHROMagar Candida.

5.2. Análise da capacidade de remoção de biofilme

De acordo com os resultados (Tabela 3), houve diferença em relação à capacidade de remoção de biofilme entre os grupos ($p < 0,001$), entre os biofilmes ($p < 0,001$) e houve interação entre os fatores ($p < 0,001$).

Tabela 3 - Tabela estatística (Teste nparLD) para a capacidade de remoção de biofilme.

Wald.test	Statistic	Df	p-value	
Grupo	172,58089	6	<0,001	
Vivo/Total	114,82410	1	<0,001	
Grupo vs Vivo/Total	18,38427	6	<0,001	
ANOVA	Statistic	Df	p-value	
Grupo	8.606186	2	<0,001	
Vivo/Total	489.828657	8	<0,001	
Grupo vs Vivo/Total	126.129310	16	<0,001	
ANOVA.test.mod.Box	Statistic	df1	df2	p-value
Grupo	8.606186	4,970282	123,3372	<0,001

Como houve significância estatística para a interação grupo x biofilme, foram realizados os testes Friedman-Conover com ajuste Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR). A estatística descritiva e as comparações pareadas para os biofilmes vivos e totais estão presentes na Tabela 4.

De acordo com os resultados, houve diferença significativa entre o biofilme vivo e o biofilme total para todos os grupos. Para o biofilme vivo, ao comparar os grupos, verificou-se que os grupos Pinheiro Branco ($p=0,020$), Placebo ($p=0,011$), Melaleuca ($p=0,009$), Eucalipto ($p < 0,001$) e Trihydral ($p < 0,001$) apresentaram menor quantidade de biofilme em relação ao Controle. Quando comparados à Água Destilada, os grupos Placebo ($p=0,001$), Pinheiro Branco ($p=0,001$), Melaleuca ($p < 0,001$), Eucalipto ($p < 0,001$) e Trihydral ($p < 0,001$) apresentaram menor quantidade de biofilme. Eucalipto apresentou menor quantidade de biofilme que Melaleuca ($p=0,012$), Placebo ($p=0,010$) e Pinheiro Branco ($p=0,005$) e semelhança estatística ao Trihydral. Os grupos Melaleuca ($p=0,016$), Placebo ($p=0,001$) e Pinheiro Branco ($p < 0,001$) apresentaram maior quantidade de biofilme que Trihydral.

Para o biofilme total, ao comparar os grupos verificou-se que os grupos Água Destilada ($p=0,004$), Placebo ($p < 0,001$), Melaleuca ($p < 0,001$), Pinheiro Branco

($p < 0,001$), Eucalipto ($p < 0,001$) e Trihydral ($p < 0,001$) apresentaram menor quantidade de biofilme em relação ao Ccontrole. Os grupos Pinheiro Branco ($p = 0,005$), Melaleuca ($p = 0,001$), Placebo ($p < 0,001$), Eucalipto ($p < 0,001$) e Trihydral ($p < 0,001$) apresentaram menor quantidade de biofilme em relação à Água Destilada. Os grupos Melaleuca ($p = 0,019$) Placebo ($p = 0,011$), e Pinheiro Branco ($p = 0,005$) apresentaram maior quantidade de biofilme que Trihydral. Eucalipto apresentou semelhança estatística ao Trihydral.

Tabela 4 - Mediana e intervalo de confiança de 95% relativos ao biofilme vivo e biofilme total.

Biofilme	Grupo	Média \pm DP (Mediana)	95% IC (mínimo; máximo)
Vivo	Controle	21,06 \pm 27,39 (13,20) ^{Aa}	8,59; 33,52 (0,00; 86,30)
	Água Destilada	3,53 \pm 3,17 (2,85) ^{Aa}	2,12; 4,93 (0,40; 15,30)
	Trihydral	0,35 \pm 0,45 (0,20) ^{Ac}	0,15; 0,54 (0,00; 1,60)
	Placebo	2,04 \pm 2,57 (1,40) ^{Ab}	0,87; 3,21 (0,00; 10,20)
	Eucalipto	0,36 \pm 0,43 (0,20) ^{Ac}	0,16; 0,56 (0,00; 1,50)
	Melaleuca	1,50 \pm 1,40 (1,05) ^{Ab}	0,88; 2,11 (0,00; 5,40)
	Pinheiro Branco	1,02 \pm 0,94 (0,85) ^{Ab}	0,58; 1,45 (0,00; 3,00)
Total	Controle	98,70 \pm 2,53 (100,00) ^{Ba}	97,54; 99,85 (92,30; 100,00)
	Água Destilada	5,29 \pm 3,92 (4,15) ^{Bb}	3,55; 7,03 (0,40; 19,60)
	Trihydral	0,94 \pm 0,54 (0,80) ^{Bd}	0,71; 1,17 (0,30; 2,20)
	Placebo	3,39 \pm 3,43 (2,10) ^{Bc}	1,82; 4,95 (0,20; 12,80)
	Eucalipto	2,94 \pm 6,65 (1,05) ^{Bcd}	-0,18; 6,05 (0,30; 30,60)
	Melaleuca	2,76 \pm 2,19 (1,75) ^{Bc}	1,79; 3,73 (0,50; 7,70)
	Pinheiro Branco	1,67 \pm 1,14 (1,55) ^{Bc}	1,14; 2,20 (0,20; 4,30)

^{AB} letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre biofilme vivo e biofilme total para cada grupo; ^{ab} letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre os grupos para cada biofilme. Friedman-Conover com ajuste Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR).

Na Figura 35 podem-se observar as áreas totais recobertas por biofilme vivo e biofilme total, identificadas nas imagens obtidas por microscopia de fluorescência, após a escovação dos espécimes metálicos.

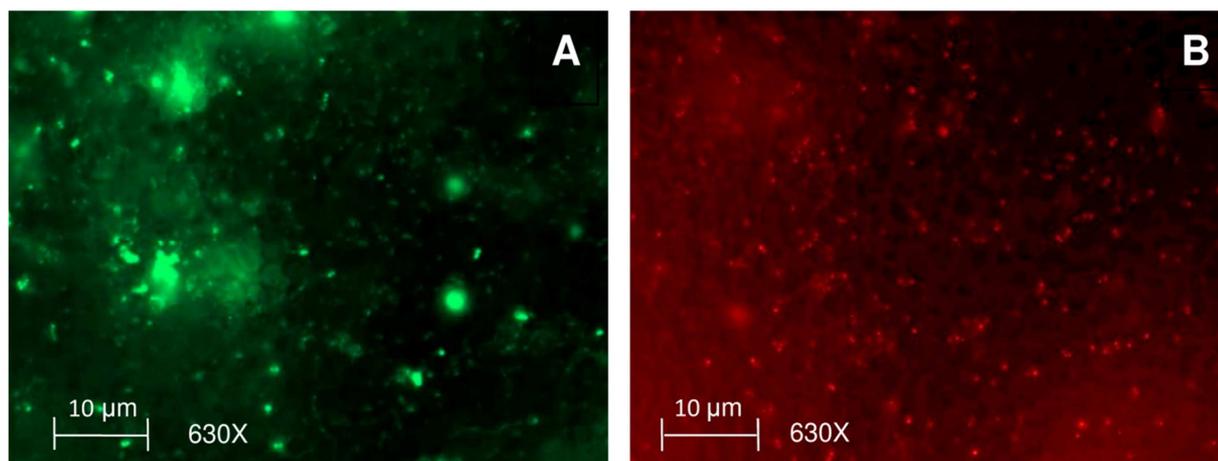


Figura 35 - Microscopia de fluorescência evidenciando a área coberta por biofilme na superfície de Co-Cr, após ensaio de escovação. A coloração verde indica células vivas. A coloração vermelha indica células mortas. (A) Filtro FS38HE (verde). (B) Filtro FS43HE (vermelho).

5.3. Avaliação da rugosidade de superfície

De acordo com os resultados obtidos relativos à rugosidade de superfície não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ($p=0,155$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Média (desvio padrão) e mediana (intervalo de confiança) relativos à rugosidade de superfície (μm).

Propriedade	Grupo	Média \pm DP (Mediana)	95% IC (mínimo; máximo)
ΔRa	Água Destilada	0,005 \pm 0,009 (0,005) ^a	-0,001; 0,011 (-0,010; 0,020)
	Placebo	0,006 \pm 0,029 (-0,002) ^a	-0,015; 0,027 (-0,030; 0,073)
	Trihydral	0,017 \pm 0,031 (0,009) ^a	-0,005; ,039 (-0,013; 0,090)
	Eucalipto	0,029 \pm 0,024 (0,030) ^a	0,012; 0,046 (-0,017; 0,063)
	Melaleuca	0,045 \pm 0,043 (0,029) ^a	0,014; 0,075 (0,000; 0,100)
	Pinheiro Branco	0,027 \pm 0,040 (0,025) ^a	-0,001; 0,056 (-0,017; 0,093)

^{ab} letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre os grupos para ΔRa . Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn com ajuste de Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR).

Na Figura 36 visualiza-se o espécime metálico após procedimento de escovação mecânica para posterior realização da análise de rugosidade de superfície.



Figura 36 - Espécime de Co-Cr após ensaio escovação.

5.4. Avaliação da alteração de brilho

De acordo com os resultados, não foi encontrada diferença significativa ($p=0,155$) de alteração de brilho entre todos os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Média (desvio padrão) e mediana (intervalo de confiança) da alteração de brilho (GU).

Propriedade	Grupo	Média \pm DP (Mediana)	95% IC (mínimo; máximo)
ΔGU	Água Destilada	41,34 \pm 71,45 (23,16) ^a	-9,78; 92,45 (-80,00; 170,04)
	Placebo	32,07 \pm 137,14 (67,36) ^a	-66,03; 130,17 (-150,98; 212,89)
	Trihydral	35,68 \pm 51,74 (32,21) ^a	-1,34; 72,69 (-44,13; 121,58)
	Eucalipto	-61,29 \pm 199,23 (-53,91) ^a	-203,82; 81,23 (-313,41; 354,94)
	Melaleuca	-19,54 \pm 144,98 (-9,03) ^a	-123,25; 84,17 (-196,11; 213,52)
	Pinheiro Branco	-73,94 \pm 86,34 (-68,18) ^a	-135,71; -12,17 (-269,47; 38,97)

^{ab} letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre os grupos para Δ GU. Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn com ajuste de Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR).

Na Figura 37 visualiza-se o espécime metálico após realização da escovação mecânica para posterior realização da análise do brilho.



Figura 37 - Espécime de Co-Cr após ensaio de escovação.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

A hipótese nula deste trabalho foi parcialmente rejeitada, visto que houve diferença na ação antibiofilme dos dentifrícios experimentais selecionados. Entretanto, não houve diferença em relação à rugosidade e à alteração de brilho na superfície metálica de Co-Cr com a utilização dos dentifrícios experimentais selecionados.

De acordo com os resultados, foi possível constatar que o simples fato de realizar a escovação mecânica já promoveu efeito antibiofilme, ou seja, a escovação com água destilada ou com dentifrício placebo apresentaram ação antibiofilme (Santos et al., 2021). Uma possível explicação para esses resultados, pode ser que apenas a escovação como método mecânico de higienização de prótese, por si só foi capaz de remover os microrganismos. Além disso, devido à superfície lisa e polida do metal, os microrganismos podem não ter se aderido tão firmemente e terem sido removidos com mais facilidade somente pela escovação. Segundo alguns autores, se o material que compõe a prótese for mais poroso, rugoso e mais permeável, maior será a adesão de microrganismos (Nikawa et al., 2003; Teughels et al., 2006; Li et al., 2010; Wu et al., 2013; Mengatto et al., 2015; Hao et al., 2018). Teughels et al. (2006) relataram que, em áreas rugosas acontecem menores forças de cisalhamento, tendo maior adesão de microrganismos, dificultando a higienização. O polimento e acabamento dos espécimes metálicos foram realizados com muita cautela para obtenção de alta padronização, resultando em rugosidade de superfície abaixo do limite clínico aceitável de 0,2 μm (Quirynen et al., 1995; Bollen et al., 1997), uma vez que o polimento está diretamente relacionado com a rugosidade (Whitehead et al., 1999).

O estudo avaliou o biofilme multiespécie, para que assim, pudesse ter uma simulação mais próxima da interação que ocorre entre os microrganismos presentes na cavidade bucal (Drake et al., 1992; Nikawa et al., 1999; Li et al., 2010; Salles et al., 2015; Paraniello et al., 2016). O biofilme constituído na superfície interna das próteses tem mais de 30 diferentes espécies, entre bactérias e fungos (Nikawa et al., 1998). Neste estudo foram selecionados os microrganismos mais comumente presentes em biofilme multiespécie relacionado à prótese (Badaró et al., 2020; Fujinami et al., 2021). O *S. mutans* é responsável pela colonização inicial, progressão e consolidação do biofilme (Thein et al., 2006), tendo também influência

na estomatite relacionada à prótese (ERP), pois apresenta potencial inflamatório próprio (Walter et al., 1986; Koopman et al., 1988; Jorge et al., 1990). O *S. aureus* é causador de infecções locais (queilite angular e mucosites) (Smith et al., 2001) e em associação ao *S. mutans* causa bacteremias (Albuquerque et al., 2004). As leveduras da espécie *Candida spp.* estão diretamente relacionados à presença de ERP em usuários de próteses dentárias (Shay, 2000; Salerno et al., 2011).

A avaliação antibiofilme foi feita pelo método de Unidades Formadoras de Colônias, com grandes aplicações na literatura (Drake et al., 1992; Nascimento et al. 2000; Karaman et al.; 2003; Albuquerque et al., 2004; Nascimento et al., 2007; Takahashi et al., 2011; Valentini et al., 2013; Wade, 2013; Allison et al., 2016; Badaró et al., 2019b) e pelo método de capacidade de remoção de biofilme (Paranhos et al., 2019; Coimbra et al., 2021).

Segundo a literatura, o óleo essencial de melaleuca propicia maior pH do meio, tornando-o mais ácido, causando danos à membrana mitocondrial dos microrganismos, comprometendo a produção de energia e levando à morte celular (Hammer et al., 2004; Carson et al., 2006; Silva et al., 2007; Casarin et al., 2017). Em diferentes estudos, foram utilizadas diferentes concentrações do óleo. Em estudo feito por Hammer et al. (1999) foi utilizada solução com concentração de melaleuca de 0,25% e tiveram como resultado a ação contra cepas de *C. albicans* e a possível aplicação tópica para infecções orais provocadas por *Candida spp.* Em outro estudo realizado por Costa et al., (2010), foram utilizadas diferentes concentrações de soluções, de 70% e 50%, e o óleo em questão apresentou ação antifúngica, mostrando potencial para ser aplicado em formulações diversas de fármacos para usufruir desse efeito benéfico. A aplicação do óleo de melaleuca pode ser ampla, como destaque para fins odontológicos, sendo utilizado em substituição à clorexidina, devido aos efeitos colaterais que ela pode causar, (manchamento, descoloração, alteração de paladar, úlceras em mucosa) (Twetman, 2004; Gunsolley et al., 2006) em tratamentos de inflamações gengivais, ação contra cárie e doenças pulpares (Oliveira et al., 2011).

O óleo essencial de Pinheiro Branco tem ação fungicida, ação antimicrobiana e antibiofilme, devido a certos componentes químicos, como altas concentrações de monoterpenos de hidrocarbonetos, α -pineno e β -pineno (Baranowska et al., 2002; Rivas et al., 2012), destacando ação em relação a *C.*

glabrata, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *S. aureus* (Kim et al., 2005; Lee et al., 2008; Abi-Ayad et al., 2011).

O dentifrício à base de óleo essencial *E. citriodora* (Eucalipto), devido à atividade fungicida comprovada para uso farmacêutico (Ramezani et al., 2002), também foi escolhido. Akin-Osanaiye et al. (2007) avaliaram e relataram a atividade antimicrobiana do óleo de eucalipto frente a cepas de *Salmonella typhi*, *S. aureus* e *E. coli*. Apesar do seu mecanismo de ação ser pouco avaliado, o óleo de Eucalipto apresenta potencial antimicrobiano (Hajji et al., 1993; Changriha et al., 1998). Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para suprir as lacunas ainda existentes quanto à sua efetiva ação antimicrobiana (Dhakad et al., 2018).

Um fator importante a ser considerado é que os diferentes resultados obtidos dos óleos essenciais podem ser devido às diferentes metodologias utilizadas, principalmente para avaliação antimicrobiana, dificultando a comparação entre os estudos (Hammer et al., 1999).

O dentifrício Trihydral foi utilizado, por ser um produto indicado para higienização de próteses, já presente no mercado e amplamente utilizado e por ser efetivo contra o biofilme presente nas próteses (Panzeri et al., 2009; Leite et al., 2014; Badaró et al., 2019b; Santos et al., 2021) A sua eficácia é devido à presença da cloramina-T, um composto que promove reações de oxidação e hidrólise de proteínas (Panzeri et al., 2009; Tirapelli et al., 2010; Leite et al., 2014).

Em relação à ação antimicrobiana, para *S. mutans*, *C. glabrata* e *C. albicans*, todos os grupos apresentaram resultados semelhantes, tendo promovido maior redução de UFC do que o controle, ou seja, o simples fato de escovar já promoveu redução de UFC de todos os microrganismos, diferentemente do que ocorreu com *S. aureus*. Santos et al., 2021, mostraram também a efetividade antimicrobiana destes mesmos dentifrícios experimentais após escovação mecânica, entretanto, utilizaram espécimes de resina acrílica. De acordo com os resultados obtidos os dentifrícios de Copaíba e Eucalipto apresentaram ação contra *S. mutans* e Copaíba, Eucalipto e *Ricinus communis* contra *C. albicans* e Pinheiro Branco e Melaleuca contra *C. albicans*. Badaró et al. (2019b), avaliaram a escovação com dentifrício experimental de *Ricinus communis* e dentifrícios comerciais (Colgate e Trihydral) em bases de próteses com material macio (Mucopren soft) e relataram que o dentifrício experimental foi eficaz contra *S. aureus* e os dentifrícios comerciais foram eficazes contra *S. aureus* e *S. mutans*. No entanto, nenhum dentifrício se mostrou eficaz

contra *C. albicans* e *C. glabrata*. A diferença de resultado do gênero *Candida* pode estar relacionada às superfícies de materiais diferentes (Nikawa et al., 2003; Teughels et al., 2006; Li et al., 2010; Wu et al., 2013; Mengatto et al., 2015; Hao et al., 2018).

Para *S. aureus*, os grupos Placebo, Eucalipto, Melaleuca, Pinheiro Branco, apresentaram semelhanças estatísticas quando comparados ao Trihydral, tendo resultados positivos na remoção de UFC. Quando comparados ao Controle e Água Destilada, promoveram melhores resultados. Trihydral apresentou diferença estatística significativa em relação a água destilada e controle, ou seja, reduziu o número de UFC, tendo apresentado o melhor resultado, corroborando os achados de Panzeri et al. (2009) e Leite et al. (2014), que encontraram que o Trihydral também se mostrou o mais eficaz frente aos microrganismos avaliados (*S. mutans*, *E. faecalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*).

Com relação ao biofilme vivo, todos os grupos experimentais apresentaram menor quantidade de biofilme, com exceção da água destilada, que se mostrou semelhante ao controle. Apesar dos dentifrícios experimentais terem apresentado eficiência na remoção de biofilme total em relação à água destilada, quando comparados aos grupos controle, a água destilada também demonstrou diminuição na quantidade de biofilme. Ou seja, somente a ação mecânica da escovação diminuiu o biofilme e não propriamente o dentifrício. Apenas o dentifrício experimental de Eucalipto apresentou semelhança e maior eficácia na remoção de biofilme quando comparado ao dentifrício já presente no mercado (Trihydral), o qual já possui eficiência comprovada (Panzeri et al., 2009; Tirapelli et al., 2010; Leite et al., 2014).

Em estudo realizado por Santos et al. (2021), o dentifrício experimental de Eucalipto a 0,5%, promoveu maior redução de UFC, tendo efetiva ação antimicrobiana, quando comparado aos dentifrícios de Melaleuca e Pinheiro Branco e resultado semelhante ao Trihydral em todas as avaliações, sendo uma alternativa a este dentifrício comercial.

Outros estudos comprovaram o potencial antimicrobiano do óleo de Eucalipto (Ramezani et al., 2002; Tolbaa et al., 2015), apontando maior eficácia contra bactérias gram-positivas em comparação às gram-negativas (Luqman et al., 2008), podendo ter sua aplicação em produtos da área odontológica (Hans et al., 2016). Essa ação pode ser responsável pelo eucaliptol, composto que corresponde

aproximadamente a 79% do óleo de Eucalipto, pois, ele ocasiona o extravasamento celular, devido à permeabilidade que provoca na membrana celular, perdendo sua função (Zengin et al., 2014).

Em relação aos efeitos adversos, a rugosidade de superfície de um material é um fator que favorece a formação e o acúmulo de biofilme (Teughels et al., 2006; Wu et al., 2013), levando a sua adesão à base da prótese (Wu et al., 2013) e podendo ocasionar a inflamação dos tecidos que a suportam (Quirynen et al., 1995).

Segundo a literatura, o grau de polimento de uma prótese está intimamente relacionado à sua rugosidade de superfície (Bollen et al., 1997; Badaró et al., 2017). Desta forma, foi cuidadosamente realizado neste estudo polimento padronizado para análise da rugosidade de superfície em politriz horizontal com diferentes granulações de lixas até que se obtivesse uma lisura de superfície homogênea, onde foram realizadas leituras diversas utilizando o rugosímetro de superfície, de tal forma que todos os espécimes metálicos apresentassem intervalo de rugosidade entre 0,04 μm e 0,08 μm de Ra, dentro do limite considerado clinicamente aceitável (Quirynen et al., 1995; Bollen et al., 1997).

O fato do estudo não apresentar alteração da rugosidade é um importante fator para indicação do uso dos dentifrícios experimentais para higienização de PPRs, pois se os dentifrícios causassem alteração de rugosidade certamente poderia haver maior acúmulo de biofilme (Mengato et al., 2015; Hao et al., 2018), uma vez que a retenção de microrganismos está significativamente relacionada ao grau de rugosidade na superfície de ligas de Co-Cr (Taylor et al., 1998). AlHamdan et al. (2021) em seu estudo usando métodos de higienização contemporâneos fotossensibilizadores (derivado de hematoporfirina) em comparação com métodos químicos de desinfecção (digluconato de clorexidina 0,12%, enzima de perborato de sódio, com ácido cítrico), relataram que a liga metálica de Co-Cr não apresentou diferença quando exposta a diversos desinfetantes químicos e fotossensibilizantes, onde o digluconato de CHX e o derivado de hematoporfirina demonstraram alta atividade antimicrobiana contra *S.aureus*, *S.mutans* e *C.albicans* com rugosidade de superfície mínima, aceitável para estruturas de uma PPR. No presente estudo, nenhum dos grupos avaliados causou alteração da rugosidade de superfície da liga metálica de Co-Cr, indicando que a escovação mecânica, o contato das cerdas com a superfície metálica dos espécimes metálicos realizada com todos os dentifrícios,

inclusive com os à base de óleos essenciais, em um período simulado de 5 anos, não causou efeitos adversos, podendo ser utilizados clinicamente.

Trihydral, em estudo feito por Santos et al. (2021), foi classificado como de baixa abrasividade, em tempo simulado de 5 anos de escovação em resina acrílica, não tendo ocasionado desgaste nos espécimes de resina acrílica. No mesmo estudo, as maiores perdas de massa ocorreram com os dentífrícios de Copaíba, Mamona e Melaleuca, indicando, maior potencial abrasivo intrínseco desses óleos, sendo classificados como dentífrícios de média abrasividade. O fato de serem testados em superfícies de resina acrílica pode explicar o resultado diferente deste estudo que foi realizado em superfícies metálicas de liga de Co-Cr, onde os dentífrícios experimentais avaliados não ocasionaram nenhum efeito adverso às superfícies metálicas. Vários estudos relataram a baixa resistência à abrasão da resina acrílica, quando é realizada a higienização com escovação e dentífrício (Wictorin, 1971; Wictorin, 1972; Freitas et al., 2006; Mendonça et al., 2006; Freitas-Pontes et al., 2009; Panzeri et al., 2009; Machado et al., 2012; Sorgini et al., 2012). Sorgini et al. (2012) demonstraram que, após ensaios de escovação em espécimes de Plexiglass, todos os dentífrícios utilizados, convencionais (Sorriso, Colgate e Close Up) e específicos (Corega e Dentu Creme), acarretaram maior perda de massa que o grupo controle (escovação com água). Em dentífrícios utilizados para dentes naturais, estudos mostram que eles possuem abrasividade média à alta, como exemplos Close up (Sorgini et al., 2012), Sorriso (Pisani et al., 2010; Sorgini et al., 2012; Sorgini et al., 2015) e Colgate (Freitas et al., 2006; Oliveira et al., 2008; Freitas-Pontes et al., 2009; Sorgini et al., 2012; Sorgini et al., 2015). Sorriso e Colgate, dentífrícios convencionais, são considerados de média abrasividade, sendo compostos por carbonato de cálcio e bicarbonato de sódio (norma ISO 8627 - Pisani et al., 2010). Em estudo realizado por Panzeri et al.(1979), verificou-se a presença de partículas abrasivas de tamanhos diversificados, com formatos irregulares, com pontas agudas e com distribuição heterogênea, favorecendo a abrasividade do dentífrício comercial Colgate. Já Corega, um dentífrício comercializado para higienização de próteses, apresenta sistema abrasivo composto por bicarbonato de sódio e sílica com característica de baixa abrasividade. No entanto, foi classificado como dentífrício de média abrasividade, assemelhando-se a dentífrícios convencionais (Pisani et al., 2010; Sorgini et al., 2012). Já o dentífrício específico para higienização de próteses Bony-Plus, por ser formulado sem partículas

abrasivas, não causa abrasividade nas superfícies protéticas (Freitas-Pontes et al., 2009). Outro dentífrico específico para higienização de próteses que apresenta baixa abrasividade é o Polident, por possuir partículas abrasivas pequenas, de formato regular e distribuição homogênea (Freitas et al., 2006; Freitas-Pontes et al., 2009; Sorgini et al., 2012; Sorgini et al., 2015). Davi et al. (2012) avaliaram diferentes soluções para imersão de próteses (hipoclorito de sódio 0,05%, Periogard, Cepacol, Corega Tabs, Medical Interporous e Polident) e relataram que algumas soluções higienizadoras devem ser utilizadas com cautela, pois ocasionaram maior rugosidade de superfície da resina acrílica e maior liberação de íons, tendo causado alterações na superfície das ligas metálicas. Felipucci et al. (2011b), também avaliaram o efeito de diferentes higienizadores em superfície de ligas metálicas para PPR (Periogard, Cepacol, Corega Tabs, Medical Interporous, Polident, hipoclorito de sódio 0,05%) e tiveram como resultado da análise de espectrometria de raios-x dispersiva de energia (EDS) a presença de oxigênio em espécimes que tiveram contato com as soluções de Medical Interporous e hipoclorito de sódio, o que pode sugerir que as duas soluções promoveram a oxidação das superfícies, levando à corrosão pontual. Outros estudos que avaliaram a rugosidade do metal, após imersão em diferentes higienizadores apontaram não ocorrer alterações da rugosidade de superfície de ligas metálicas (Davi et al., 2012; Ponto-Wolska et al., 2018; Vasconcelos et al., 2019; Curylofo et al., 2020; AlHamdan et al., 2021), provavelmente pelo fato de não utilizarem o hipoclorito de sódio. Os efeitos deletérios do hipoclorito de sódio podem alterar seriamente a forma e a resistência mecânica dos componentes metálicos da prótese devido ao ataque dos íons cloreto nas superfícies metálicas, causando manchas, corrosão e rugosidade (Backenstone et al., 1977; Keyf et al., 2003; Felipucci et al., 2011a; Felipucci et al., 2011b), contribuindo com o acúmulo de biofilme (Zhang et al., 2017).

Dentífricos experimentais, são formulados com a sílica (Tixosil 73), substância que tem características de baixa abrasividade e partículas altamente solúveis em água (Panzeri et al., 2009). A glicerina também está presente na formulação de dentífricos experimentais, sendo uma substância diluente que contribui para menor ocorrência de abrasividade (Harte et al., 1976). Santos et al. (2021) relataram que os dentífricos formulados com óleo essencial de Eucalipto e Pinheiro Branco apresentaram perda de massa intermediária, com valores

semelhantes ao Trihydral, dentifrício convencional, que teve perda de massa semelhante à água. No presente estudo, tendo como componentes a glicerina que diminuiu a ocorrência de abrasividade, foram utilizados como agentes abrasivos para formulação dos dentifrícios experimentais, Tisoxil 73 (sílica abrasiva) e Tisoxil 43B (sílica espessante). Apesar da associação do agente abrasivo ao agente espessante gerar pequeno aumento na ação abrasiva, devido à interação das partículas de diferentes tamanhos e formato das duas sílicas (abrasiva e espessante), alterando seu grau de abrasividade (Lara et al., 1998; Pedrazzi et al., 1999), os resultados deste estudo não apresentaram alteração da rugosidade de superfície dos espécimes metálicos de liga de Co-Cr. Segundo Lara et al. (1998), não é apenas o agente abrasivo que determina maior ou menor abrasividade, mas um conjunto de fatores, a integração de diferentes agentes abrasivos com diferentes espessantes, que são componentes fundamentais presentes nos dentifrícios comerciais para o controle da abrasividade.

De acordo com os resultados de alteração do brilho, uma estrutura metálica de uma PPR não teria alterações no brilho após escovação com os dentifrícios experimentais avaliados. Keyf et al. (2003) utilizaram para imersão de espécimes de liga de Co-Cr, pastilha efervescente (Corega tabs) e solução à base de 53% de hipoclorito de sódio e 47% de carbonato de sódio, correspondente à água sanitária. Segundo os autores, essas soluções devem ser utilizadas com cautela em próteses com componentes metálicos, pois causaram alterações de refletância clinicamente significativas na superfície da liga. Os dentifrícios experimentais avaliados no presente estudo não causaram danos ao brilho da superfície de Co-Cr.

Apesar da grande quantidade de pesquisas relacionadas aos higienizadores de prótese, ainda não se tem um protocolo padrão de higienização e totalmente definido para os usuários de PPR (Sedrez-Porto et al., 2016; Curylofo et al., 2020). A explicação para isso, pode ser pelas diferentes metodologias e os diferentes resultados (Nikawa et al., 1999; Pereira-Cenci et al., 2008). São escassas as pesquisas em superfície metálica que avaliaram a ação antimicrobiana de substâncias (Taylor et al., 1998; Vasconcelos et al., 2020; Curylofo et al., 2021), sendo a grande maioria de estudos com avaliação da superfície de resina acrílica (Silva et al., 2008; Lee et al., 2009; Paranhos et al., 2009; Li et al., 2010; Coimbra et al., 2016). Devido a isso, é importante a realização de novos estudos que possam elucidar a ação atibiofilme e osefeitos de dentifrícios experimentais à base de óleos

essenciais em superfícies metálicas de Co-Cr, pois possuem a vantagem de serem de menos onerosos e de mais fácil acesso a população. Análises complementares de superfície com ensaios de corrosão, liberação de íons poderiam contribuir significativamente com informações a respeito das alterações superficiais ocorridas na superfície metálica de Co-Cr durante o tempo determinado para realização do estudo.

Futuras pesquisas devem considerar o desenvolvimento de novas formulações de dentifrícios com maior concentração de óleo, visando aumentar a eficácia antibiofilme e ausência de efeitos adversos à superfície metálica de Co-Cr. Novos estudos com análises de outros microrganismos presentes no biofilme protético também são de fundamental importância e estudos clínicos devem ser realizados para avaliar os dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais quanto à sua ação antibiofilme dentro da rotina de higienização de pacientes usuários de PPRs, analisando também a ação da escovação a longo prazo nas superfícies dos materiais constituintes da prótese.

7. Conclusão

7. CONCLUSÃO

Com base nas condições experimentais e resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

1. Todos os grupos promoveram redução de UFC frente aos microrganismos *S. mutans*, *C. glabrata* e *C. albicans*, quando comparados ao controle. Em relação ao *S. aureus* os grupos Placebo, Eucalipto, Melaleuca e Pinheiro Branco obtiveram resultados positivos na redução de UFC, sendo semelhantes ao Trihydral, e quando comparados ao Controle e Água Destilada, promoveram melhores resultados.
2. Todos os dentifrícios experimentais à base de óleos essenciais apresentaram resultados semelhantes ao dentifrício comercial Trihydral™ já existente no mercado, promovendo redução do número de UFC.
3. Todos os grupos de dentifrícios experimentais apresentaram menor quantidade de biofilme total, quando comparados ao controle.
4. Dentre os dentifrícios experimentais analisados, o de Eucalipto foi o que apresentou menor quantidade de biofilme comparado aos de Melaleuca e Pinheiro Branco, apresentando semelhança estatística ao dentifrício comercial Trihydral™.
5. Nenhum grupo, inclusive os dos dentifrícios à base de óleo essencial, alterou a rugosidade e o brilho da superfície de Co-Cr, após a simulação de cinco anos de escovação.
6. O dentifrício experimental à base de óleo essencial de Eucalipto se mostrou promissor na higienização de PPRs.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abere DJ. Post – placement care of complete and removable partial dentures. *Dent Clin North Am.* 1979; 23(6):143-51.
- Abi-Ayad M, Abi-Ayad FZ, Lazzouni HA, Rebiahi AS. S.A. Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from algeria (tlemcen). *J Nat Prod Plant resour.* 2011; 1(1):33- 36.
- Acharya BL, Nadiger R, Shetty B, Gururaj G, Kumar KN, Darshan DD. Brushing-induced surface roughness of two nickel based alloys and a titanium based alloy: a comparative study - in vitro study. *J Int Oral Health.* 2014; 6(3):36-49.
- Akin-Osanaiye BC, Agbaji AS, Dakare MA. Antimicrobial Activity of Oils and Extracts of *Cymbopogon citratus* (Lemon Grass), *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus camaldulensis*. *J Med Sci.* 2007; 7(4):694-697.
- Albuquerque RJ, Head TW, Mian H, Ridrigo A, Müller K, Sanches K, Ito IY. Redution of salivar *S. aureus* and mutans group streptococci by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. *Quintessence Int.* 2004; 35(8):635-40.
- AlHamdan EM, Al-Saleh S, Nisar SS, Alshiddi I, Alqahtani AS, Alzahrani KM, Naseem M, Vohra F, Abduljabbar T. Efficacy of porphyrin derivative, Chlorhexidine and PDT in the surface disinfection and roughness of Cobalt chromium alloy removable partial dentures. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 36:102515.
- Allison DL, Willems HME, Jayatilake JAMS, Bruno VM, Peters BM, Shirliff ME. *Candida*-Bacteria interactions: their impact on human disease. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(3).
- Alves D, Costa AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A. Cloreto de cetilpiridínio – revisão de literatura. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2012; 53(3):181-9.
- Amaral BA, Barreto AO, Seabra EG, Roncalli AG, Carreiro AFP, Almeida EO. A clinical follow-up study of the periodontal conditions of RPD abutment and non-abutment teeth. *J Oral Rehabil.* 2010; 37:545–552.
- Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, Souza RF, Paranhos HFO, Candido RC, Marin JM, Souza-Gugelmin MCM. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and mutans streptococci in denture biofilm. *Gerodontology.* 2011; 28(4):264-270.
- Andrade IM, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Pisani MX, de Andrade KM, Paranhos Hde F. Trial of experimental toothpastes regarding quality for cleaning dentures. *Int J Prosthodont.* 2012; 25(2):157-9.
- Andrade IM, Andrade KM, Pisani MX, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Paranhos Hde F. Trial of an experimental castor oil solution for cleaning dentures. *Braz Dent J.* 2014; 25(1):43-7.

André RFG, Andrade IM, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO, Pimenta FC, Ito IY. Prevalence of mutans streptococci isolated from complete dentures and their susceptibility to mouthrinses. *Braz Dent J.* 2011; 22(1):62-7.

Andrucioli MC, Macedo LD, Panzeri H, Lara EH, Paranhos HF. Comparison of Two Cleansing Pastes for the Removal of Biofilm from Dentures and Palatal Lesions in Patients with Atrophic Chronic Candidiasis. *Braz Dent J.* 2004; 15 (3):220-224.

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; 117(6):729-734.

Arruda CNF, Salles MM, Oliveira VC, Macedo AP, da Silva CHL, Paranhos HFO. Using denture cleansers to control biofilm from dentures and brushes: A randomized crossover clinical trial. *Int J Prosthodont.* 2021; 34(3):291–299.

Baba Y, Sato Y, Owada G, Minakuchi S. Effectiveness of a combination denture-cleaning method versus a mechanical method: comparison of denture cleanliness, patient satisfaction, and oral health-related quality of life. *J Prosthodont Res.* 2018; 62(3):353-358.

Backenstose WM, Wells JG. Side effects of immersion-type cleansers on the metal components of dentures. *J Prosthet Dent.* 1977; 37(6):615-21.

Badaró MM, Salles MM, Leite VMF, Arruda CNF, Oliveira VC, Nascimento C, Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. Clinical trial for evaluation of *Ricinus communis* and sodium hypochlorite as denture cleanser. *J Appl Oral Sci.* 2017; 25(3):324-334.

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.* 2019a; 28(2): e857-e862.

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.* 2019b; 30(3):252-258.

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; 124(6):690-698. Bae CH, Lim YK, Kook JK, Son MK, Heo YR. Evaluation of antibacterial activity against *Candida albicans* according to the dosage of various denture cleansers. *J Adv Prosthodont.* 2021; 13(2):100-106.

Baranowska M.K., Mardarowicz M., Wiwart M., Pobłocka L., Dynowska M. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2002; 57:478–482.

Basson Nj, Quick NA, Thomas CJ. Household products as sanitising agents in denture cleansing. *J Dent Assoc S Afr.* 1992; 47(10):437-9.

- Batish DR, Singh HP, Setia N, Kaur S, Kohli RK. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2006; 61(7-8):465-71.
- Bergman B, Hugoson A, Olsson CO. Caries, periodontal and prosthetic findings in patients with removable partial dentures: a ten-year longitudinal study. *J Prosthet Dent*. 1982; 48:506–510.
- Brasil. Secretaria Nacional de Saúde de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. 1989; 22:241.
- Bergman BC, Hugoson A, Olsson CO. A 25-year longitudinal study of patients treated with removable partial dentures. *J Oral Rehabil*. 1995; 22: 595-599.
- Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature, *Dent Mater*. 1997; 13(4):258-69.
- Borges AH, Pedro FLM, Semenoff TDV, Porto AN, Semenoff-Segundo A, Buzelle SL. Antimicrobial effectiveness of different trademarks mouthwashes with and without alcohol against different organisms: in vitro study. *Rev Odonto Ciênc*. 2010; 25(2):178-81.
- Brooker MIH, Kleinig DA. Field Guide to Eucalypts. vol. 3. Norther Australia. Blooming Books, Victoria, Australia. 2004
- Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974; 82:151–190.
- Budtz-Jorgensen E. Materials and Methods for Cleaning Dentures. *J Prosthet Dent*. 1979; 42(6):619- 23.
- Cakan U, Yuzbasioglu E, Kurt H, Kara HB, Turunç R, Akbulut A, Aydin KC. Assessment of hygiene habits and attitudes among removable partial denture wearers in a university hospital. *Niger J Clin Pract*. 2015; 18(4):511-5.
- Cardoso, Mayra et al. Edentulismo no Brasil: tendências, projeções e expectativas até 2040. *Ciência & Saúde Coletiva* [online]. 2016; 21(4).
- Carr AB, Brown DT. McCracken: Prótese Parcial Removível. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Microbiol. Rev*. 2006; 19:50–56.
- Carvalho I.O., Purgato G.A., Píccolo M.S., Pizziolo V.R., Coelho R.F., Diaz-Muñoz G., Diaz M.A.N. In vitro anticariogenic and antibiofilm activities of toothpastes formulated with essential oils. *Arch. Oral Biol*. 2020; 117:1–8.

Casarin M., Pazinato J., Santos R.C.V., Zanatta F.B. Melaleuca alternifolia and its application against dental plaque and periodontal diseases: A systematic review. *Phytother. Res.* 2017; 32:230–242.

Chang YH, Lee CY, Hsu MS, DU JK, Chen KK, Wu JH. Effect of toothbrush/dentifrice abrasion on weight variation, surface roughness, surface morphology and hardness of conventional and CAD/CAM denture base materials. *Dent Mater J.* 2021; 40(1):220-227.

Changriha N, Cherif YF, Baailouamer A, Meklati. Antimicrobial of algerian cyprus and eucalyptus essential oils. *Rev. Italian Eppos.* 1998; 25:11-16.

Cinquanta L, Varoni EM, Barbieri C, Sardella A. Patient attitude and habits regarding removable denture home hygiene and correlation with prosthesis cleanliness: A cross-sectional study of elderly Italians. *J Prosthet Dent.* 2021; 125(5):772.

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(5):377-83.

Coimbra FC, Salles MM, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Paranhos HFO. Antimicrobial efficacy of complete denture cleansers. *Am J Dent.* 2016; 29(3):149-153.

Coimbra FCT, Rocha MM, Oliveira VC, Macedo AP, Pagnano VO, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO. Antimicrobial activity of effervescent denture tablets on multispecies biofilms. *Gerodontology.* 2021; 1:87-94.

Costa ACBP, Teodoro GR, Ferreira TM, Silva FS. Antifungal activity of Melaleuca alternifolia essential oil on yeasts isolated from HIV positive pregnant women with oral candidiasis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 2010; 69(3).

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *J Appl Microbiol.* 2000; (1):170-5.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. *Molecules.* 2001; 6(2):87–91.

Cross LJ, Williams DW, Sweeny CP, Jackson MS, Lewis MA, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(3):351-8.

Curylofo PA, Raile PN, Vasconcellos GLL, Macedo AP, Pagnano VO. Effect of Denture Cleansers on Cobalt-Chromium Alloy Surface: A Simulated Period of 5 Years' Use. *J Prosthodont.* 2020; 29(2):142-150.

Curylofo PA, Raile PN, de Oliveira VC, Macedo AP, Guedes DFC, Paranhos HFO, Pagnano VO. Antimicrobial activity of experimental chitosan solutions on acrylic resin and cobalt-chromium surfaces. *Int J Prosthodont.* 2021 Feb 26.

- Davi LR, Felipucci DN, de Souza RF, Bezzon OL, Lovato-Silva CH, Pagnano VO, Paranhos Hde F. Effect of denture cleansers on metal ion release and surface roughness of denture base materials. *Braz Dent J*. 2012; 23(4):387-93.
- Diefenbach A.L., Muniz F.W.M.G., Oballe H.J.R., Rösing C.K. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. *Phytother. Res*. 2018; 32:586–596.
- Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *J Prosthet Dent*. 1988; 60(4):467–70.
- Dhakad AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM, Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. *J Sci Food Agric*. 2018; 98(3):833-848.
- Douglass CW, Watson AJ. Future needs for fixed and removable partial dentures in the United States. *J Prosthet Dent*. 2002; 87(1):9-14.
- Drake D, Wells J, Ettinger R. Efficacy of denture cleansing agents in na in vitro bacteria-yeast colonization model. *Int J Prosthodont*. 1992; 5(3):214-20.
- Dyer D, Macdonald E, Newcombe RG, Scratcher C, Ley F, Addy M. Abrasion and stain removal by different manual toothbrushes and brush actions: studies in vitro. *J Clin Periodontol*. 2001; 28:121-7.
- FAO (Food and Agricultural Organization), Global Forest Resources Assessment 2000 Main Report. FAO Forestry Paper 140. Food and Agricultural Organization, 2001.
- Felipucci DNB, Davi LR, Paranhos HF, Bezzon OL, Silva RF, Barbosa Junior F, Pagnano VO. Effect of different cleansers on the weight and ion release of removable partial denture: an in vitro study. *J Appl Oral Sci*. 2011a; 19(5):483-7.
- Felipucci DN, Davi LR, Paranhos HF, Bezzon OL, Silva RF, Pagnano VO. Effect of different cleansers on the surface of removable partial denture. *Braz Dent J*. 2011b; 22(5):392-397.
- Ferreira MA, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-Garcia RC, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. *Clin Oral Invest*. 2009; 13(2):237-42.
- Freitas KM, Paranhos HFO. Weight Loss of five commercially available denture teeth after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci*. 2006; 14(4):242-6.
- Freitas-Pontes KM, Silva-Lovato CH, Paranhos HF. Mass loss of four commercially available heat-polymerized acrylic resins after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci*. 2009; 17(2):116-21.
- Fujinami W, Nishikawa K, Ozawa S, Hasegawa Y, Takebe J. Correlation between the relative abundance of oral bacteria and *Candida albicans* in denture and dental plaques. *J Oral Biosci*. 2021; 63(2):175-183.

Gautam N, Sharma A, Bashir U, Rapolu S, Mamatha N, Sravani S. Effect of Different Dentifrices on the Surface Roughness of Acrylic Resins: An in vitro Study. *J Contemp Dent Pract.* 2017; 18(8):679-682.

Gonçalves LFF, Neto DRS, Bonan RF, Carlo HL, Batista AUD. Complete and Partial Removable Dentures Cleansing Methods. *Rev Bras de Ciênc Saúde.* 2011; 15(1):87-94.

Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137(12):649-57.

Hajji F, Tetouani SF, Tantau EA. Antimicrobial activity of twenty- one eucalyptus essential oils. *Fitot.* 1993; 1:71-77.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and others plants extracts. *J appl microbiol.* 1999; 86:985-990.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on candida albicans, candida glabrata and saccharomyces cerevisiae. *J antimicrob chemother.* 2004; (53):1081-5.

Hans VM, Grover HS, Deswal H, Agarwal P. Antimicrobial Efficacy of Various Essential Oils at Varying Concentrations against Periopathogen Porphyromonas gingivalis. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(9):ZC16-ZC19.

Hao Y, Huang X, Zhou X, Li M, Ren B, Peng X, Cheng L. Influence of Dental Prosthesis and Restorative Materials Interface on Oral Biofilms. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(10):3157.

Harte DB, Manly RS. Four variables affecting magnitude of dentifrice abrasiveness. *J Dent Res.* 1976; 55(3): 322-7. Haselden CA, Hobkirk JA, Pearson GJ, Davies EHA. Comparison between the wear resistance of three types of denture resin to three different dentifrices. *J Oral Rehabil.* 1998; 25:335-9.

Hoad-Reddick G, Grant AA. Prosthetic status: the formation of a schedule. *J Prosthet Dent.* 1988; 59(1):105-10.

Ito IY, Fröner IC, Mian H, GO C. Castor oil: antimicrobial activity of detergent derived from ricinoleic acid. *J Dent Res.* 1999; 78:344.

Jorge AE, Broglio LZ, de Almeida OP, Jorge Júnior J. Estomatite por prótese total--presença de bactérias e fungos [Denture stomatitis--presence of bacteria and yeasts]. *Arq Cent Estud Curso Odontol.* 1990; 27(1-2):9-15.

Kapur KK. Veterans Administration cooperative dental implant study--Comparison between fixed partial dentures supported by blade-vent implants and removable partial dentures. Part III: Comparison between two treatment modalities. *J Prosthet Dent.* 1991; 62:272-283.

Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ogütçü H, Sengül M, Adigüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus L. *J Ethnopharmacol.* 2003; 85(2-3):231-5.

- Keyf F, Güngör T. Comparison of effects of bleach and cleansing tablet on reflectance and surface changes of a dental alloy used for removable partial dentures. *J Biomater Appl.* 2003; 18(1):5-14.
- Kiesow A, Sarembe S, Pizzey RL, Ax AS, Bradshaw DJ. Material compatibility and antimicrobial activity of consumer products commonly used to clean dentures. *J Prosthet Dent.* 2016; 115:189-198.
- Kim YS, Shin DH. Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* s. And z.) Extracts *Food microbiol.* 2005; 22: 37-45.
- Koopmans AS, Kippuw N, de Graaff J. Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. *J Dent Res.* 1988; 67(9):1246-50.
- Koseki Y., Tanaka R., Murata H. Desenvolvimento de limpador de dentadura antibacteriano para escovação contendo óleos essenciais de tea tree e capim-limão. *Dente. Mater. J.* 2018; 37:659-666.
- Lara EHG, Panzeri H. Study of the abrasiveness of basic dentifrices formulations. *Rev Cienc Farm.* 1998; 19:207-224.
- Lee JH, Yang HY, Lee HS, Hong SK. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from cones of *Pinus koraiensis*. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(3): 497-502.
- Lee D, Howlett J, Pratten J, Mordan N, McDonald A, Wilson M, Ready D. Susceptibility of MRSA biofilms to denture-cleansing agents. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 291(2):241-6.
- Leite V.M.F., Pinheiro J.B., Pisani M.X., Watanabe E., Souza R.F., Paranhos H.F.O., Silva-Lovato C.H. In Vitro Antimicrobial activity of an experimental dentifrice based on *Ricinus communis*. *Braz. Dent. J.* 2014; 25:191–196.
- Li L, Finnegan MB, Özkan S, Kim Y, Lillehoj PB, Ho CM, Lux R, Mito R, Loewy Z, Shi W. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. *Mol Oral Microbiol.* 2010; 25(6):384-90.
- Lucena-Ferreira SC, Cavalcanti IMG, Del Bel Cury AA. Efficacy of Denture Cleansers in Reducing Microbial Counts from Removable Partial Dentures: A Short-Term Clinical Evaluation. *Braz Dent J.* 2013; 24(4):353-6.
- Lucena-Ferreira SC, Ricomini-Filho AP, Silva WJ, Cury JA, Cury AA. Influence of daily immersion in denture cleanser on multispecies biofilm. *Clin Oral Invest.* 2014; 18(9):2179-85.
- Luqman S, Dwivedi GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS. Antimicrobial activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. *Inter. J. Es. Oil Therap.* 2008; 2:69–75.
- Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE. Surface roughness of denture base and reline materials after disinfection by immersion in chlorhexidine or microwave irradiation. *Gerodontology.* 2012; 29(2):e375-82.

Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Buzalaf MAR. Rational use of dentifrices. *RGO*. 2011; 59(4):615-625.

Marsh PD. Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. *Dent Clin North Am*. 2010; 54(3):441-54.

Mendonça MJ, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Weight loss and surface roughness of hard chairside reline resins after toothbrushing: influence of postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(3):281-7.

Mengatto CM, Marchini L, Bernardes LAS, Gomes SC, Silva AM, Barbosa CMR. Partial denture metal framework may harbor potentially pathogenic bacteria. *J Adv Prosthodont*. 2015; 7(6):468–474.

Melo JF, Gjerdet NR, Erichsen ES. The effect of abrasion on corrosion of dental Co-Cr alloys. An in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 1985; 43(2):69-73.

Mijiritsky E. Implants in Conjunction With Removable Partial Dentures: A Literature Review, *Implant Dent* 2007; 16(2):146-154.

Milward P, Katechia D, Morgan MZ. Knowledge of removable partial denture wearers on denture hygiene. *Br Dent J*. 2013; 215 (10):E20.

Mizugai H, Isogai E, Hirose K, Chiba T. Effect of denture wearing on occurrence of *Candida* species in the oral cavity. *J App Res*. 2007; 7(3):250-254.

Molina C, Nogués L, Martínez-Gomis J, Peraire M, Salsench J, Sevilla P, Gil FJ. Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes of various abrasivities. Part II: corrosion and ion release. *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19(9): 3015-3019.

Mordenti JJ, Lindstrom RE, Tanzer JM. Atividade de ricinoleato de sódio contra placa in vitro. *J. Farmácia. Sci*. 1982; 71:1419-1421.

Moghadamtousi S.Z., Kadir H.A., Hassandarvish P., Tajik H., Abubakar S., Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Res. Int*. 2014; 2014:1–12.

Mullally BH, Linden GJ. Periodontal status of regular dentist attendants with and without removable partial dentures. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1994; 2:161-163.

Namala BB, Hegde V. Comparative evaluation of the effect of plant extract, *Thymus vulgaris* and commercially available denture cleanser on the flexural strength and surface roughness of denture base resin. *J Indian Prosthodont Soc*. 2019; 19(3):261-265.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiology*. 2000; 31(4):247-56.

- Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Júnior AMB, Trindade RC. Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods. *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17(1):108-113.
- Neppelenbroek KH. The importance of daily removal of the denture biofilm for oral and systemic diseases prevention. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(6):547-548.
- Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. *JDent.* 1998; 26(4):299-304.
- Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999; 12(2):153-159.
- Nikawa H, Jin C, Makihiro S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(3):243-50.
- Nogués L, Martínez-Gomis J, Molina C, Peraire M, Salsench J, Sevilla P, Gil FJ. Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes with various abrasivities. Part I: wear behavior. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(9):3041-3048.
- Ojah P, Luniyal C, Nair C, Astekar M, Pal A, Chopra M. Anti candidal efficacy of commercially available triphala, neem, denture cleanser and natural aloe vera leaf on heat polymerized acrylic resin. *J Indian Prosthodont Soc.* 2021; 21(2):167-172.
- Oliveira LV, Mesquita MF, Henriques GE, Consani RL, Fragozo WS. Effect of polishing technique and brushing on surface roughness of acrylic resins. *J Prosthodont.* 2008; 17(4):308-11.
- Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL; Andrade CR; Spolidorio DMP. Use of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin. *Rev Bras PI Med.* 2011; 13(4):492-499.
- Panzeri H, Lara EHG, Siéssere F, Marchetti RM. Evaluation of toothpastes. 1st part - consistency, density, pH, "shelf life", and water loss. *Odontol Mod.* 1979; 6(2):4-12.
- Panzeri H, Lara EH, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Gulgemin MCMS, Tirapelli C, Cruz PC, Andrade IM. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. *Gerodontology.* 2009; 26(1):26-33.
- Papadiochou S., Polyzois G. Práticas de higiene em prótese removível: Uma revisão sistemática. *Int. J. Dent. Hyg.* 2017; 16:179-201.
- Papadiochou S, Polyzois G. Hygiene practices in removable prosthodontics: A systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2018; 16(2):179-201.
- Paranhos HFO, Lara EHG, Panzeri H, Candido RC, Ito IY. Capacity of denture plaque/biofilm removal and antimicrobial action of a new denture paste. *Braz Dent J.* 2000a; 11(2):97-104.

Paranhos HFO, Lara EHG, Pardini LC, Panzeri H. Evaluation (in laboratory and clinic) of a specific paste for cleaning complete dentures. *Rev Fola Oral*. 2000b; 4(18):76-82.

Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil*. 2007a; 34(8):606-12.

Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Venezian GC, Macedo LD, de Souza RF. Distribution of biofilm on internal and external surfaces of upper complete dentures: the effect of hygiene instruction. *Gerodontology*. 2007b; 24(3):162-8.

Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, Ito IY. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont*. 2009; 18(5):427-31.

Paranhos HFO, Salles AE, Macedo LD, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Watanabe E. Complete denture biofilm after brushing with specific denture paste, neutral soap and artificial saliva. *Braz Dent J*. 2013; 24:47- 52.

Paranhos HFO, Bezzon OL, Davi LR, Felipucci DN, Silva CH, Pagnano VO. Effect of cleanser solutions on the color of acrylic resins associated with titanium and nickel-chromium alloys. *Braz Oral Res*. 2014; 28(1):1-7.

Paranhos HFO, Coimbra FC, Salles MM, Oliveira VC, Macedo AP, Pagnano VO, Silva-Lovato CH. In vitro evaluation of the effectiveness of alkaline peroxide solutions in reducing the viability of specific biofilms. *Am J Dent*. 2019; 32(4):201-207.

Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. *Am J Dent*. 2016; 29(3):154-60.

Pedrazzi V, Lara EHG, Panzeri H. Silica in toothpastes: physical and physicochemical aspects. *Cosmet toiletries*. 1999; 11:66-9.

Peracini A. Soluções higienizadoras de prótese total: avaliação da remoção de biofilme e efeito sobre propriedades da resina acrílica termopolimerizável [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2012.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008; 16(2):86-94.

Pinelli LAP, Montandon AAB, Corbi SCT, Moraes TA, Fais LMG. Ricinus communis treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. *J Oral Rehabil*. 2013; 40(5):375-80.

Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HF, Silva-Lovato CH, DE Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont*. 2010; 19(5):369-373.

Pontes KMF, Lovato CHS, Paranhos HFO. Mass loss of four commercially available heat-polymerized acrylic resins after toothbrushing with three different dentifrices. *Appl Oral Sci*. 2009; 17(2):116-21.

Porta SRS, Ferreira SCL, Silva WJ, Cury AADB. Evaluation of sodium hypochlorite as a denture cleanser: a clinical study. *Gerodontology*. 2015; 32: 260-266.

Ponto-Wolska M, Wagner L. Assessment of the influence of selected electrolytic polishing process parameters on the surface roughness of casts made of the CoCrMo alloy. *Dent Med Probl*. 2018; 55(4):395-398.

Purnaveja S, Fletcher AM, Ritchie GM, Amin WM, Moradians S, Dodd AW. Compatibility of denture cleansers with some new self-curing denture base materials. *Biomaterials*. 1982; 3:251-2.

Quirynen M, Bollen CM: The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 1995; 22:1-14.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98(1):53-9.

Ramage G, Milligan S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C, Bagg J, Culshaw S. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol*. 2012; 3:220.

Ramage G, O'Donnell L, Sherry L, Culshaw S, Bagg J, Guzik MC, Brown C, McKenzie D, Cruz L, Macinnes A, Bradshaw D, Varghese R, Pereira PG, Jose A, Sanyal S, Robertson D. Impact of frequency of denture cleaning on microbial and clinical parameters – a bench to chairside approach. *J Oral Microbiol*. 2019; 11(1):1538437.

Ramezani H, Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia*. 2002; 73(3):261-2.

Ribeiro DG, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Jorge JH, Garcia PP. Effect of oral hygiene education and motivation on removable partial denture wearers: longitudinal study. *Gerodontology*. 2009; 26:150-156.

Ribeiro Rocha GDS, Neves Duarte T, de Oliveira Corrêa G, Nampo FK, de Paula Ramos S. Chemical cleaning methods for prostheses colonized by *Candida* spp.: A systematic review. *J Prosthet Dent*. 2020; 124(6):653-658.

Richmond R, Macfarlane TV, Mccord JF. An evaluation of the surface changes in PMMA biomaterial formulations as a result of toothbrush/dentifrice abrasion. *Dent Mater*. 2004; 20(2):124-32.

Rissin L, Feldman RS, Kapur KK, Chauncey HH. Six-year report of the periodontal health of fixed and removable partial denture abutment teeth. *J Prosthet Dent*. 1985; 54:461-467.

Rivas da Silva AC, Lopes PM, Barros de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*. 2012; 17:6305–6316.

Rocha MM, Carvalho AM, Coimbra FCT, Arruda CNF, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Paranhos HFO. Complete denture hygiene solutions: antibiofilm activity and effects on physical and mechanical properties of acrylic resin. *J Appl Oral Sci*. 2021; 29:20200948.

Rodrigues Garcia RC, Joane Augusto De S JR, Rached RN, Del Bel Cury AA. Effect of denture cleansers on the surface roughness and hardness of a microwave-cured acrylic resin and dental alloys. *J Prosthodont*. 2004; 13:194-199.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A, Petruzzi M, Serpico R. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2):139-43.

Salles AE, Macedo LD, Fernandes RA, Silva-Lovato CH, Paranhos Hde F. Comparative analysis of biofilm levels in complete upper and lower dentures after brushing associated with specific denture paste and neutral soap. *Gerodont*. 2007; 24(4):217-23.

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

Santos ALS, Carvalho IS, Prata JM, Martins MB, Souza LOP, Galdino ACM, Braga-Silva LA, Branquinha MH, Rodrigues SM, Sousa LVNF. Candida Albicans Involvement in Denture-Related Stomatitis: A Serious and Real Clinical Concern. *J Infect Dis Diagn*. 2016; 104(1):1-3.

Santos ACM, Oliveira VC, Macedo AP, Bastos JK, Ogasawara, MS, Watanabe E, Chaguri IM, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO. Effectiveness of Oil-Based Denture Dentifrices Organoleptic Characteristics, Physicochemical Properties and Antimicrobial Action. *Antibiotics*. 2021; 10:813.

Schmutzler A, Rauch A, Nitschke I, Lethaus B, Hahnel S. Cleaning of removable dental prostheses - A systematic review. *J Evid Based Dent Pract*. 2021; 21(4):101644.

Sedrez-Porto JA, Santos MBF, Pereira-Cenci T. Cleaning methods for removable dentures: A critical review of the literature. *Braz Dent Sci*. 2016; 19(3).

Sesma N, Morimoto S. Estomatite protética: etiologia, tratamento e aspectos clínicos. *J Biodent Biomat*. 2011; 2:24-29.

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

Shaheen SS, Reddy P, Hemalatha SR, Doshi D, Kulkarni S, Kumar M. Eficácia antimicrobiana de dez dentifrícios à base de plantas comercialmente disponíveis contra microflora oral específica – estudo in vitro. *J. Clin. Diag. Res*. 2015; 9:42-46.

- Silva CJ, Barbosa LCA, Maltha CRA, Pinheiro AL, Fyaz MDI. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (myrtaceae) species grown in Brazil. *Flavour Frag J*. 2007; 22:474-8.
- Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont*. 2008a; 17(8):627-33.
- Silva-Lovato CH, Wever B, Adriaens E, Paranhos HF, Watanabe E, Pisani MX, Souza RF, Ito IY. Clinical and antimicrobial efficacy of NitrAdine – based disinfecting cleaning tablets in complete denture wearers. *J App Oral Sci*. 2010; 18(6):560-5.
- Silva PMB, Porto VC, Bonachella WC. Periodontal aspects in patients using removable partial dentures. *Rev Odonto Cienc*. 2008; 23(2): 297-301.
- Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol*. 2001; 50(11):940-946.
- Smolarek PC, Esmerino LA, Chibinski AC, Bortoluzzi MC, Dos Santos EB, Junior VAK. In vitro antimicrobial evaluation of toothpastes with natural compounds. *Eur J Dent*. 2015; 9(4):580-586.
- Sorgini DB, Silva-Lovato CH, Souza RF, Davi LR, Paranhos HFO. Abrasiveness of conventional and specific denture-cleansing dentifrices. *Braz. Dent. J*. 2012; 23(2):154-159.
- Sorgini DB, da Silva-Lovato CH, Muglia VA, de Souza RF, de Arruda CN, Paranhos Hde F. Adverse effects on PMMA caused by mechanical and combined methods of denture cleansing. *Braz Dent J*. 2015; 26(3):292-6.
- Soukoulis S, Hirsch R. The effects of a tea tree oil-containing gel on plaque and chronic gingivitis. *Aust Dent J*. 2004; 49(2):78-83.
- Souza RF, de Freitas Oliveira Paranhos H, Lovato da Silva CH, Abu-Naba'a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009; (4):CD007395.
- Souza RF, Silva-Lovato CH, Arruda CN, Regis RR, Zanini A, Longo DL, Peracini A, Andrade IM, Watanabe E, Paranhos HFO. Efficacy of a propolis solution for cleaning complete dentures. *Am J Dent*. 2019; 32(6):306-310.
- Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Lett Appl Microbiol*. 2013; 56(11):14-20.
- Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011; 90 (3):294-303.
- Taylor R, Maryan C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *J Prosthet Dent*. 1998; 80(5):592-7.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, et al: Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17:68-8.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(8):672-80.

Tirapelli C, Landi F, Ribas J, Panzeri H, Lara EH. Evaluating an experimental dentifrice containing chloramine-T: A preliminary study. *Oral Health Prev. Dent.* 2010; 8:375–381.

Tolbaa HH, Moghrania A, Mouffok DB, Maachia RK. Essential oil of algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. *J. Mycol. Med.* 2015; 25:128–133.

Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res.* 2004; 38(3):223-9.

Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *J Dent.* 2013; 41(5):420-7.

Van CL. Preventie: het succes van een partiële gebitsprothese [Prevention: the success of a partial denture]. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 2009; 116(11):617-621.

Varma SR, Sherif H, Serafi A, Fanas SA, Desai V, Abuhijleh E. The antiplaque efficacy of two herbal-based toothpastes: A clinical intervention. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* 2018; 8: 21–27.

Vasconcelos GLL, Curylofo PA, Raile PN, Macedo AP, Paranhos HFO, Pagnano VO. Effect of Alkaline Peroxides on the Surface of Cobalt Chrome Alloy: An In Vitro Study. *J Prosthodont.* 2019; 28(1): 337-341.

Vasconcelos GLL, Curylofo PA, Targa Coimbra FC, Oliveira VC; Macedo AP; Paranhos HFO; Pagnano VO. In Vitro Antimicrobial Activity of Effervescent Denture Tablets on the Components of Removable Partial Dentures. *Int J Prosthodont.* 2020; 33(3): 315-320.

Zhang L, Yang Z, Chen D, Huang Z, Li Y, Lan X, Su P, Pan W, Zhou W, Zheng X, Du Z. Variation on Composition and Bioactivity of Essential Oils of Four Common Curcuma Herbs. *Chem Biodivers.* 2017; 14(11).

Zengin H, Baysal AH. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules.* 2014; 19(11):17773-98.

Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69(1):137-43.

Walter B, Frank RM, Steuer P. Ultrastructural development of dated plaque in case of denture stomatitis. *J Biol Buccale.* 1986; 14(2): 115-24.

Wataha JC, Lockwood PE, Frazier KB, Khajotia SS. Effect of toothbrushing on elemental release from dental casting alloys. *J Prosthodont.* 1999; 8(4):245-251.

Wataha JC, Lockwood PE, Noda M, Nelson SK, Mettenburg DJ. Effect of toothbrushing on the toxicity of casting alloys. *J Prosthet Dent.* 2002; 87(1):94-98.

Wataha JC, Lockwood PE, Messer RL, Lewis JB, Mettenburg DJ. Brushing-induced surface roughness of nickel-, palladium-, and gold-based dental casting alloys. *J Prosthet Dent.* 2008; 99(6):455-60.

Watanabe E, Nascimento AP, Guerreiro-Tanomaru JM, Razaboni AM, de Andrade D, Tanomaru-Filho M. Antiseptic mouthwashes: in vitro antibacterial activity. *Acta Odontol Latinoam.* 2015;28(2):180-4

Watanabe E, Razaboni AM, Beraldo CC, Giordani AT, Andrade D. Determinação in vitro da atividade antibacteriana de detergente de mamona contra bactérias hospitalares. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2013;34(1):59-62.

Whitehead SA, Shearer AC, Watts DC, Wilson NH. Comparison of two stylus methods for measuring surface texture. *Dent Mater.* 1999; 15(2):79-86.

Wiatrak K, Morawiec T, Rój R, Kownacki P, Nitecka-Buchta A, Niedzielski D, Wychowański P, Machorowska-Pieniążek A, Cholewka A, Baldi D, Mertas A. Evaluation of Effectiveness of a Toothpaste Containing Tea Tree Oil and Ethanolic Extract of Propolis on the Improvement of Oral Health in Patients Using Removable Partial Dentures. *Molecules.* 2021; 26(13):4071.

Wictorin L. Effect of toothbrushing on acrylic resin veneering material. I. A study of abrasion in vitro. *Sven Tandlak Tidskr.* 1971; 64(4):247-54.

Wictorin L. Effect of toothbrushing on acrylic resin veneering material. II. Abrasive effect of selected dentifrices and toothbrushes. *Acta Odontol Scand.* 1972; 30(3): 383-95.

Wostmann B, Budtz-Jorgensen E, Jepson N, Mushimoto E, Palmqvist S, Sofou A, Owall B. Indications for removable partial dentures: A literature review. *J Prosthodont.* 2005; 18:139-145.

Wu T, Hu W, Guo L, et al: Development of a new model system to study microbial colonization on dentures. *J Prosthodont.* 2013; 22:344-350.