

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Tese

**Efetividade de diferentes protocolos químicos de higienização de próteses totais: ensaio
clínico randomizado e comparação de métodos de avaliação**

Fernanda Valentini Mioso

Pelotas, 2016

Fernanda Valentini Mioso

Efetividade de diferentes protocolos químicos de higienização de próteses totais: ensaio clínico randomizado e comparação de métodos de avaliação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Dentística.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Pereira Cenci

Co-orientador: Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Noéli Boscato

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M669e Mioso, Fernanda Valentini

Efetividade de diferentes protocolos químicos de higienização de próteses totais : ensaio clínico randomizado e comparação de métodos de avaliação / Fernanda Valentini Mioso ; Tatiana Pereira Cenci, orientadora ; Maximiliano Sérgio Cenci, Noéli Boscato, coorientadores. — Pelotas, 2016.

129 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Produtos químicos. 2. Limpeza de dentadura. 3. Ensaio clínico randomizado. 4. Quantificação de biofilme. 5. Sistema de análise de imagem. I. Cenci, Tatiana Pereira, orient. II. Cenci, Maximiliano Sérgio, coorient. III. Boscato, Noéli, coorient. IV. Título.

Black : D32

Fernanda Valentini Mioso

Efetividade de diferentes protocolos químicos de higienização de próteses totais: ensaio clínico randomizado e comparação de métodos de avaliação

Tese apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 27/02/2016

Banca examinadora:

Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci (orientadora)
Doutora em Clínica Odontológica (Área de Prótese Dentária) pela Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Aline Pinheiro de Moraes
Doutora em Odontologia (Área de Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Françoise Hélène van de Sande Leite
Doutora em Odontologia (Área de Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Giana da Silveira Lima
Doutora em Odontologia (Área de Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Mateus Bertolini Fernandes dos Santos
Doutor em Clínica odontológica (Área de Prótese Dental) pela Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Jovito Adiel Skupien (suplente)
Doutor em Odontologia (Área de Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (suplente)
Doutor em Odontologia (Área de Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho, aos meus pais pelo amor incondicional, me mostraram a direção correta e ensinaram os valores da vida, sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Ao meu marido pelo amor, apoio, confiança e motivação, que sempre me impulsionou em direção às vitórias dos meus desafios. Aos meus orientadores, pela tamanha dedicação. Vocês foram meu espelho e minha inspiração em vários momentos. Aprendi muito com vocês, e tudo só foi possível porque tive o amparo de vocês. Se como docente eu for parecida com o exemplo que vocês foram pra mim, estarei muito feliz e realizada.

Agradecimentos

Agradeço à **Universidade Federal de Pelotas**, e à **Faculdade de Odontologia** que foi minha segunda casa durante muitos anos, me orgulho por ser formada nesta instituição de tamanho gabarito e credibilidade.

Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, em especial ao coordenador do curso Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, por toda dedicação e empenho. Tenho muito orgulho em ter feito parte desta equipe.

Agradeço à Deus, pelo dom da vida e por iluminar meus caminhos, proporcionando a realização de todos os meus sonhos.

Agradeço aos meus pais, Dilene Valentini e Celonir Valentini pelo amor sem limites. A conquista de mais essa etapa profissional só foi possível por que nunca me faltou suporte e apoio em etapas anteriores. Obrigada pela compreensão nos momentos em que estive ausente, pelo carinho, pela preocupação e pela torcida. Sem vocês seria impossível realizar meus sonhos. Um muito obrigado seria pouco pelo muito que fizeram. Amo vocês.

Agradeço ao meu marido Rafael Mioso, foi encantador em todos os momentos e fundamental para eu não desistir nos momentos mais difíceis. Obrigada por tudo, pelos conselhos, pelo apoio, pelo companheirismo e por acreditar tanto em mim. Te amo muito.

Agradeço ao meu irmão Rafael Cezar Valentini, pelo incentivo e apoio durante todos esses anos. Sempre foi minha inspiração, sou tua fã e te amo de paixão.

Agradeço à minha cunhada Tanise Librelotto Ferraz, pela amizade e carinho durante todos esses anos, tu mora no meu coração.

Agradeço de coração a minha orientadora Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci, pela paciência, comprometimento e valiosos ensinamentos. Meu carinho e minha gratidão serão eternos. Acompanhou-me desde o TCC até o tão almejado Doutorado, então só tenho a agradecer e desejar que Deus te ilumine sempre. Muito obrigada por tudo.

Agradeço à minha co-orientadora Profa. Dra. Noéli Boscato, pela amizade, pelos conselhos e ensinamentos que me fortaleceram ao longo desses anos. Tu foste fundamental em muitos momentos. Obrigada por acreditar em mim e me ensinar tudo de forma tão simples e prática. Muito obrigada de coração.

Agradeço ao meu co-ordenador Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, por contribuir direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela ajuda, orientação e serenidade.

Agradeço à todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia pela convivência e pelos valiosos ensinamentos.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia em especial a Carmen Lúcia Machado Lopes que sempre se mostrou solícita em ajudar no que foi preciso para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço em especial as colegas Fernanda Weingartner Machado e Tamires Timm Maske, pela ajuda, responsabilidade e dedicação no desenvolvimento desse trabalho. Vocês formam muito importante para o desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigada.

Agradeço ainda à Fradeane Gonçalves Braz, Katielle Valente Brauner e Quéren Ferreira da Rosa pela disponibilidade e dedicação que tiveram durante as fases de coleta do experimento clínico. Muito Obrigada.

Agradeço todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. Pelas trocas de conhecimentos e experiências, pela agradável convivência, compartilhamos sofrimentos, angústias mais também muitas alegrias e conquistas. Forte abraço a todos.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar ao menos na lua. Sonhem com a lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações.”

(AUGUSTO CURY)

Notas Preliminares

A presente tese foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição 4 – estrutura em Artigos, descrita no Apêndice D do referido manual. <<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=documentos&i=7>> Acesso em: <inserir data>.

O projeto de pesquisa contido nesta tese é apresentado em sua forma final após qualificação realizada em 27 de Setembro de 2012 e aprovado pela Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Flávio Fernando Demarco, Rógerio Castilho e Adriana Etges.

Resumo

VALENTINI, M. Fernanda. **Efetividade de diferentes protocolos químicos de higienização de próteses totais: ensaio clínico randomizado e comparação de métodos de avaliação.** 2016. 130f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A inadequada higienização de próteses totais favorece o acúmulo de biofilme e a colonização de microrganismos podendo originar infecções oportunistas como a estomatite por dentadura e outras doenças sistêmicas como pneumonia de aspiração. No entanto, ainda são escassos os estudos clínicos comprovando qual seria o melhor protocolo químico de desinfecção e remoção do biofilme em próteses totais. Adicionalmente, não há um consenso sobre qual metodologia seria mais sensível para avaliar a eficácia de protocolos usados na limpeza química de próteses totais. Assim, os objetivos desse estudo foram avaliar através de um ensaio clínico, a eficácia de diferentes protocolos químicos de higiene na redução da viabilidade microbiana do biofilme formado em usuários de próteses totais (Parte 1) e comparar os resultados dos diferentes protocolos de higienização obtidos neste ensaio clínico através da metodologia microbiológica (análise objetiva) e da metodologia computadorizada (análise subjetiva) (Parte 2). O ensaio clínico teve um delineamento randomizado, cruzado e triplo cego (pacientes, dentista e análise dos resultados), onde usuários de próteses totais sem diagnóstico de estomatite protética foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 40$) de acordo com o produto químico de higiene usado: água (placebo), solução de hipoclorito de sódio à 0,5%, solução de gluconato de clorexidina à 0,12% e uma solução de bicarbonato de sódio à 5%. O biofilme formado sobre a região vestibular dos pré-molares e sobre a superfície interna das próteses totais foram coletados e avaliados em cada fase experimental, em 7 e 14 dias. Os resultados foram analisados através da análise de variância de dois critérios, seguido pelo teste de Tukey. O uso de hipoclorito de sódio e clorexidina originou em uma menor contagem de *microrganismos totais* e de *estreptococcus do grupo mutans* em 14 dias ($P=0,04$) e ambos mostraram eficácia semelhante ($P=0,819$). Não houve diferença estatisticamente significativa para as contagens de *C. albicans*, *não-albicans* e *lactobacilos* para qualquer tratamento e tempo avaliado ($P>0,05$). O uso das soluções químicas, hipoclorito de sódio e clorexidina, resultou em uma adequada estratégia para o controle de biofilme em usuários de próteses totais. Para o estudo de comparação das metodologias foram utilizados os resultados obtidos do ensaio clínico randomizado ($n=40$), o qual comparou quatro soluções químicas na redução do biofilme. Para análise foram considerados os resultados obtidos na análise microbiológica e aqueles obtidos da análise das imagens do biofilme coradas. De um lado, da superfície interna da prótese superior foi coletado o biofilme formado para fazer a contagem dos microrganismos totais. Do outro lado o biofilme foi corado, fotografado e analisado utilizando um programa computadorizado (Image Tool 3.0) que quantifica o biofilme através de pixel. Os dados foram analisados através da análise de variância de dois

critérios seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5% para todas as análises. Análises microbiológicas mostraram que o hipoclorito de sódio e clorexidina proporcionaram mais baixas contagens de microorganismos totais ($P < 0,001$), enquanto que a análise das imagem não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Portanto, as duas metodologias determinaram resultados diferentes, enquanto a análise microbiológica mostrou sensibilidade para detectar diferenças entre os tratamentos testados.

Palavras-chave: Produtos Químicos; Limpeza de Dentadura; Ensaio Clínico Randomizado; Higiene de Dentadura; Quantificação de Biofilme; Sistema de Análise de Imagem; Quantificação de Biofilme; Ferramenta de Limiarização.

Abstract

VALENTINI, M. Fernanda. **Effectiveness of different chemical hygiene protocols of complete denture: a randomized clinical trial and comparasion of assessment methods.** 2016. 130f. Thesis (PhD in Dentistry) – Graduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas.

The inadequate denture hygiene contributing to biofilm accumulation and colonization of the microorganisms may contribute to opportunistic infections such as denture stomatitis and other systemic diseases such as aspiration pneumonia. However, still are few clinical studies showing which would be the best chemical protocol for the disinfection and removal of biofilm on complete dentures. Additionally, there is no consensus of which methodology is the more sensitive to evaluate the effectiveness of chemical cleaning dentures. Thus, the aims of this study were to evaluate through a clinical trial, the effectiveness of different chemical hygiene clinical protocols on reducing microbial viability of the biofilm formed on complete denture wearers (Part 1) and compare data of different chemical hygiene protocols obtained in this clinical trial by microbiological (objective analysis) and computerized (subjective analysis) methodologies (Part 2). This clinical trial was a randomized design, cross and triple blind (subjects, dentist and outcome analysis), where complete denture wearers without candidiasis were randomly divided into four groups ($n = 40$) according to the chemical cleanser: water (placebo), 0.5% sodium hypochlorite solution, 0.12% chlorhexidine gluconate solution or 5% sodium bicarbonate solution. The biofilm formed on palate and denture's teeth were collected and assessed on each experimental phase for microbiological analysis at the 7th and 14th days. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Turkey's test. The use of sodium hypochlorite and chlorhexidine led to lower total microorganisms and mutans streptococci counts at 14 days ($P=0.04$) with both showing similar effectiveness ($P=0.819$). There was no statistically significant difference in *C. albicans*, non-*albicans* and lactobacilli counts in all treatments and time points studied ($P>0.05$). The use of sodium hypochlorite and chlorhexidine chemical cleansers resulted in an appropriate strategy for biofilm control in complete denture wearers. The study of comparative methodologies used data of a randomized clinical trial ($n=40$) comparing four chemical cleanser solutions. For analysis were considered the results obtained in the microbiological analysis and those obtained from the analysis of the staining images on the computer. On one side, biofilm formed on internal surface of the maxillary dentures was collected and processed to obtain total microorganisms count. On the other side the biofilm was stained, and the photographs analyzed using a computer program that quantifies the biofilm by pixel. Data were analyzed with two-way ANOVA followed by Turkey *post hoc* test with a significance level set at 5% for all analyses. Microbiological analysis showed that sodium hypochlorite and chlorhexidine yielded in lower microbial counts ($P<0.001$), whereas the image analysis showed no statistically significant difference among

treatments ($P>0.05$). The two methodologies resulted in different outcomes, with microbial analysis count showing a more sensitive effect of the treatments tested.

Key-words: Chemical Products; Cleaning Dentures; Randomized Controlled Trial; Denture Hygiene; Plaque Quantification, Image Analysis System, Denture Hygiene, Qualitative Biofilm, Image Thresholding.

Sumário

1 Introdução	15
2 Projeto de Pesquisa	20
3 Relatório do trabalho de campo	53
4 Artigo 1	60
5 Artigo 2	81
6 Conclusão	102
Referências	103
Apêndices	115
Anexos	129

1 Introdução

Pacientes idosos usuários de próteses totais necessitam de atenção especial do cirurgião-dentista, devido às características das próteses e à idade avançada dos pacientes, o qual pode culminar para uma diminuição das habilidades manuais, levando a uma inadequada higienização (PARANHOS et al., 2007). Tal aspecto resulta na formação de biofilme (NEILL et al., 1968) e facilita o desenvolvimento das alterações bucais tais como a estomatite protética (ABELSO, 1985).

Esta inflamação também é denominada de estomatite induzida por prótese, ou candidíase atrófica crônica, que ocorre em 15 a 70% dos usuários de próteses totais (CUETO et al., 2013). Tal prevalência tem grande impacto na saúde pública porque os microrganismos presentes nestes biofilmes apresentam resistência às terapias antifúngicas convencionais (LEWIS et al., 2001; DONLAN et al., 2002; AL-FATTANI et al., 2006; NETT et al., 2007; GONZALEZ et al., 2008; NIIMI et al., 2010), e ainda, a doença mostra alta taxa de recorrência (GENDREAU et al., 2011). Em função disso, a organização mundial da saúde (OMS) introduziu as doenças orais como um problema de saúde pública devido à sua alta prevalência e incidência em todo o mundo (PETERSEN, 2003).

Adicionalmente é importante salientar que qualquer fonte infecciosa presente na cavidade bucal pode comprometer a saúde geral, aumentando os riscos de doença sistêmica tais como a pneumonia de aspiração em pacientes idosos usuários de prótese total (VAN DER MAAREL et al., 2013; GENDREAU et al., 2011). Assim, utilizar protocolos de higiene de prótese associando à imersão em soluções desinfetante é recomendado, pois auxiliam na remoção do biofilme, atuando na

destruição dos microrganismos (ASAD et al., 1992) além de evitar a recolonização (FERREIRA et al., 2009).

Com relação aos produtos químicos, alguns estudos *in vitro* (JIN et al., 2003; NIKAWA et al., 2003) e *in vivo* (GORNITSKY et al., 2002; RAHAL, 2003) comprovaram a sua eficácia. Porém, outros estudos afirmam que quando utilizados isoladamente, estes produtos não são efetivos na remoção do biofilme sobre as próteses (SESMA et al., 1999). Os métodos químicos de limpeza podem ser divididos em cinco grupos, dependendo de seus constituintes e mecanismo de ação (TOMAMOTO et al., 1991). Estes incluem peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos, ácidos, desinfetantes e enzimas (NIKAWA et al., 1999; DE SOUZA et al., 2015).

A maioria dos limpadores químicos de prótese são peróxidos alcalinos, sendo que os peróxidos não reduzem a quantidade de biofilme sobre a prótese, não causam melhora nos tecidos palatinos inflamados, nem são eficazes contra espécies de *Candida* (PARANHOS et al., 2007), embora mostrem atividade antimicrobiana contra *Streptococcus do grupo mutans* (SILVA et al., 2008; ANDRADE et al., 2011).

Os hipocloritos são úteis para quebrar os componentes do biofilme da prótese eficientemente, desagregando-o. Estudos demonstraram que a imersão das próteses em solução de 0,5% de hipoclorito de sódio (BELL et al., 1989; SILVA et al., 2009; FERREIRA et al., 2009) foram eficazes para eliminar *C. albicans* e *C. glabrata*. O diglucanato de clorexidina é um anti-séptico de largo espectro, tanto no combate de *Candida albicans* como *não- albicans* (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2000; 2001a), apresente excelentes propriedades antimicrobianas, substantividade, capacidade de reduzir a formação de biofilme e de desorganizar o biofilme pré-formado (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2001; EPSTEIN, 1990; FERRETTI et

al.,1990). Em um estudo clínico recente, tanto a imersão em gluconato de clorexidina de 2% por 5 minutos ou 0,12% por 20 minutos, foram eficientes na redução de biofilme (ANDRADE et al., 2011).

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3), mesmo com o uso clínico difundido, possui poucos estudos clínicos na literatura com relação à utilização como substância terapêutica na prevenção da estomatite protética. No entanto, em um estudo in vitro (SOUSA et al., 2009), parece ser uma alternativa viável, uma vez que reduziu significativamente a adesão de *Candida albicans* e *Streptococcus* do grupo mutans nas superfícies de resina acrílica. (SILHACEK; TAAKE, 2005). Assim, estudos que avaliem a eficácia de diferentes soluções químicas no controle da formação de biofilme devem visar encontrar uma solução padrão que apresente atividade antimicrobiana sem prejudicar a saúde do paciente ou causar alterações nas características físico-estruturais da prótese (AZEVEDO et al., 2006; PAVARINA et al., 2003).

A literatura têm relatado diferentes metodologias utilizadas em ensaios clínicos para avaliar a eficácia de protocolos químicos de limpeza na redução de biofilme formado sobre próteses totais (NIKAWA et al., 1999; ULUDAMAR et al., 2010; DE SOUZA et al., 2015). Os métodos mais utilizados são a avaliação microbiológica (contagem de unidade formadora de colônia - CFU), a digitalização microscópica, a coloração associada com a avaliação visual do biofilme, a análise UV, o sistema planimétrico de biofilme e os métodos computadorizados (sistema de análise de imagem) (CRUZ et al., 2011; De ANDRADE et al 2011; De SOUZA et al 2015).

Desta forma, há dificuldades para selecionar uma metodologia adequada e capaz de quantificar o biofilme formado nas superfícies das próteses totais devido à

falta de padronização e validação dessas metodologias (CRUZ et al., 2011; NIKAWA et al, 1999; ULUDAMAR et al., 2010; De Souza et al., 2015). Ainda, existem poucos estudos clínicos randomizados (ECRs), bem delineados que possam trazer evidência para as condutas clínicas, determinando qual protocolo químico de higiene é mais eficaz na manutenção e prevenção do acúmulo de biofilme em prótese total (MCCABE et al., 1996; NIKAWA et al., 1999; CRUZ et al., 2011; De SOUZA et al., 2015. Desta forma, este estudo avaliou diferentes protocolos químicos de limpeza de prótese total bem como comparou duas diferentes metodologias envolvidas neste processo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Avaliar através de um ensaio clínico randomizado a eficácia de diferentes protocolos químicos de higienização na redução da viabilidade microbiana no biofilme formado em próteses totais, visando encontrar um protocolo efetivo de higienização baseado em evidência. Ainda, objetiva-se comparar os dados deste ensaio clínico randomizado que avaliou diferentes protocolos químicos de higienização de próteses totais, utilizando duas metodologias diferentes, a análise microbiológica e a análise computadorizada.

1.2.2 Específicos

Artigo 1

- (i) Avaliar clinicamente o efeito dos principais métodos químicos de higienização na viabilidade microbiana no biofilme formado sobre a superfície de próteses totais;

- (ii) Encontrar um protocolo químico eficaz para servir como padrão na higienização de próteses totais;

Artigo 2

- (iii) Encontrar uma metodologia para servir como padrão em ensaios clínicos de avaliação de higiene de prótese total.

As hipóteses nulas testadas foram as de que:

Artigo 1 - Não haveria diferença entre os protocolos químicos de higienização testados ;

Artigo 2 - Não haveria diferença nos resultados encontrados entre metodologias diferentes.

2 Projeto de Pesquisa

2.1 Introdução

Polímeros são amplamente utilizados em Odontologia (SHAMACK et al., 2000) sendo o polimetilmetacrilato (PMMA) o polímero de escolha para confecção da base de próteses totais. Esse material apresenta boas propriedades mecânicas e estéticas, sendo, no entanto, suscetível a colonização por microrganismos, em especial a *Candida albicans* (VERRAN et al., 1997; NIKAWA et al., 1997). Este patógeno pode estar relacionado com o desenvolvimento da estomatite protética (WEBB et al., 1998; BARBEAU et al., 2003; ZAREMBA et al., 2006), que geralmente afeta os portadores de próteses removíveis (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1981; JEGANATHAN; LIN, 1992.; ESPINOZA et al., 2003; EMAMI et al., 2007).

A candidíase bucal pode ser classificada a partir da presença de grandes placas brancas pseudomembranosas na mucosa, língua e boca, lesões palatais eritematosas características da candidíase atrófica crônica e queilite angular nas comissuras labiais (SAMARANAYAKE, 1990; SCULLY et al., 1994; SHAY et al., 1997). Apesar da *Candida albicans* também ser encontrada em indivíduos saudáveis (CALDERONE, 2002.; SAMARANAYAKE et al., 2002), fatores locais e predisponentes é que irão induzir a modificação da microbiota bucal, tornando este patógeno de comensal a patogênico. A candidíase pode ser classificada de acordo com Newton em Tipo (I) lesões inflamatórias, eritematosas; Tipo (II) Eritema difuso, simples ou generalizado em mucosa coberta por prótese e Tipo (III) lesões granulares ou papilares comumente envolvendo a parte central do palato duro e rebordo alveolar.

A adesão de microrganismos às próteses totais depende da estrutura, composição e propriedades físico-químicas da superfície, além das células microbianas (BELLON-FONTAINE et al., 1990; BUSSCHER; COWAN; VAN DER MEI, 1992), as quais irão aderir via formação de um biofilme. A formação de biofilmes multi-espécie, envolto por uma matriz extracelular, protege o biofilme da ação de patógenos exógenos, da ação de alguns medicamentos e da ação da própria saliva, o que aumenta a chance de sobrevivência de todos os constituintes do ambiente bucal. Este fato é considerado o primeiro passo para a colonização fúngica, levando a um processo infeccioso (CHANDRA et al., 2001; CANNON; CHAFFIN, 1999; RAMAGE et al., 2004).

Dessa forma, as espécies de *Candida* podem aderir diretamente ou via uma camada de “placa de dentadura” às bases de próteses (SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1980; BRANTING et al., 1989; EDGERTON et al., 1993; COULTHWAITE; VERRAN, 2007). Na cavidade bucal, durante o processo de colonização, o microrganismo, para alcançar e interagir com o substrato necessita interagir com a película adquirida, formada pela adsorção seletiva de glicoproteínas salivares, que se forma imediatamente após o contato da superfície da prótese com a saliva (DE JONG et al., 1984; QUIRYNEN; BOLLEN, 1995). A formação desta película está diretamente associada à sua capacidade de molhamento que é regulada pela energia livre de superfície (SIPAHI et al., 2001), influenciando a adesão de *Candida* sobre o material (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995; SIPHAH et al., 2001).

Um dos fatores importantes que afetam a adesão dos microrganismos na base das próteses totais é a interação hidrofóbica (RADFORD et al., 1999; MINAGI et al., 1985) e hidrofílica (HORBETT et al., 1988), que é caracterizada como

molhabilidade. A capacidade de formar uma superfície com características de pouca aderência está diretamente ligada à capacidade de um material ou estrutura ter baixa energia de superfície e ao ângulo de contato formado com o aderente (GAO; MCCARTHY, 2006). Além disso, tem sido sugerido que as superfícies das resinas podem alterar a interação iônica entre a base da prótese e dos microrganismos (PARK et al., 2003; PURI et al., 2008; PARK et al., 2008). As interações hidrofóbicas ocorrem entre a superfície das células e o substrato que possa permitir que as células suportem as forças de atração repulsivas (DONLAN et al., 2002), independentemente da espécie microbiana que irá aderir por interação hidrofóbica, esta dependerá da hidrofobicidade da membrana dos microrganismos (YOSHIJIMA et al., 2010).

Em relação aos microrganismos, o *Streptococcus mutans*, possui superfície hidrofóbica (GIBBONS et al., 1983; TAHMOURESPOUR et al., 2008), bem como a *Candida glabrata*, que apresenta hidrofobicidade maior do que *C. albicans*, reforçando a sua adesão a superfície convencional do acrílico (YOSHIJIMA et al., 2010). Assim, modificar a superfície hidrofílica deveria ser um método eficaz de inibição inicial da aderência de microrganismos em especial *C. albicans* (AZUMA et al., 2012). Embora alguns materiais como a sílica venham sendo amplamente aplicados numa variedade de materiais dentários (KANTA et al., 2005) para revestir e modificar materiais hidrofóbicos, poucos estudos têm investigado o efeito da adesão na redução de *C. albicans* em PMMA (AZUMA et al., 2012).

Neste contexto, a modificação da superfície dos biomateriais, por meio de tratamento com plasma tem sido proposto (EVERAERT et al., 1998; SHMAC et al., 2000; YILDIRIM et al., 2005), focando no aumento da hidrofiliabilidade dos biomateriais (LAI et al., 2006; YILDIRIM et al., 2005; RANGEL et al., 2004), modificação da

composição química das superfícies (HODAK et al., 2008; SUANPOOT et al, 2008) e a redução na adesão bacteriana (RAD; AYHAN; PISKIN, 1998), além de permitir que fluoretos se incorporem nos materiais (RANGEL et al., 2003; GURUVENKET et al., 2008), o que poderia resultar em uma carga negativa na superfície (ROBINSON et al., 1997) e redução da aderência de *Candida* (PARK et al., 2003; KLOTZ et al, 1985; ZAMPERINI et al., 2010). Outras formas de cobertura como o metacrilóioxetil fosforilcolina (MPC) (ISHIHARA et al., 1992; IWASAKI et al., 2003; OGAWA et al., 2003) e o polietilenotereftalato (HIROTA et al., 2005) diminuem a aderência dos microrganismos às superfícies. Desta forma, pode ser sugerido que a base da prótese carregada com materiais negativos possam impedir a adesão de *C. albicans* e reduzir o desenvolvimento de estomatite protética (HIROTA et al., 2005). Novas coberturas repelentes à água têm obtido elevados ângulos de contatos, o que torna a composição menos tóxica e ainda eficiente (LAKSHMI et al., 2011; DASTJERDI et al., 2012).

No entanto, é importante salientar que a efetividade da modificação destas superfícies deve ser testada em modelos complexos de biofilmes, uma vez que estes são mais resistentes aos agentes antimicrobianos (COSTERTON et al, 1999; WILSON et al, 1996). Desta forma o modelo de biofilme de microcosmo proveniente de saliva humana assemelha-se a placa natural e supera muitas dificuldades encontradas em estudos de biofilme *in vitro* e *in vivo* (SISSONS et al, 1991; SISSONS, 1997). Além disso, é um dos mais apropriados métodos de crescimento de biofilmes, uma vez que permite a produção de uma comunidade estável de biofilme bucal (KINNIMENT et al, 1996; HOPE et al., 2002). No entanto, uma cobertura anti-aderente, com agentes que minimizem a formação de biofilme, ainda

é pouco estudada, até o presente momento nenhum estudo mostrou a redução da adesão através de um modelo de biofilme de microcosmos.

Por outro lado, como se sabe, a manutenção da saúde bucal em pacientes usuários de próteses totais através da remoção de biofilme é um problema aparentemente comum (SRINIVASAN; GULABANI, 2010), especialmente pacientes geriátricos (KULAK-OZKAN et al., 2002; OPDAM, 1992). Para esses pacientes, uma combinação de limpeza mecânica e química com imersão da prótese em higienizadores, é obrigatória para redução do acúmulo de biofilme (BUDTZ JØRGENSEN, 1979,1983; NIKAWA, 1999).

Com relação aos produtos químicos, alguns estudos *in vitro* (JIN et al., 2003; NIKAWA et al., 2003) e *in vivo* (GORNITSKY et al., 2002; RAHAL, 2003) comprovaram a sua eficácia. Porém, outros estudos afirmam que quando utilizados isoladamente, estes produtos não são efetivos na remoção do biofilme sobre as próteses (SESMA et al., 1999). Os métodos químicos de limpeza podem ser divididos em cinco grupos, dependendo de seus constituintes e mecanismo de ação (TOMAMOTO et al., 1991). Estes incluem peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos, ácidos, desinfetantes e enzimas. A maioria dos limpadores químicos de prótese são peróxidos alcalinos, sendo que os peróxidos não reduzem a quantidade de placa sobre a prótese, não causam melhora nos tecidos palatinos inflamados, nem são eficazes contra espécies de *Candida* (PARANHOS et al., 2007), embora mostrem atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* (SILVA et al., 2008; ANDRADE et al., 2011).

Os hipocloritos são úteis para quebrar os componentes do biofilme da prótese eficientemente, desagregando-o, do substrato aderido mas têm efeito danoso sobre os metais odontológicos, resinas acrílicas e condicionadores de tecidos (ABELSON

et al., 1981; BOSCATO et al., 2009) criando irregularidades na superfície da prótese, podendo facilitar maior formação de biofilme. Contudo, estudos demonstraram que a imersão das próteses em solução de 5,25% (KINYON et al,1989; YILMAZ et al., 2005; DAHLAN et al. 2011) ou 0,5% de hipoclorito de sódio (BELL et al., 1989; SILVA et al., 2009; FERREIRA et al., 2009) foram eficazes para eliminar *C. albicans* e *C. glabrata*. Ainda, parece ser recomendado uma solução de duas colheres de chá de hipoclorito de sódio em um copo de água (100ml) durante 10 minutos para o tratamento de próteses contaminadas com *Candida albicans* (DAHLAN et al., 2009).

O sabão como agente higienizador auxiliar é um produto acessível e isento de abrasivos, com efetividade relatada sobre microrganismos anaeróbios e leveduras (MOORE et al., 1984) e sobre manchas (MCCABE et al., 1995). Estudos indicam que a associação do sabão de coco ao hipoclorito de sódio ou ao cloreto de cetilpiridíneo consiste em um método eficaz, embora experimentos clínicos sobre sua efetividade, como método isolado, não sejam relatados (BARNABÉ et al., 2004; MARTINS SILVA, 1996) .

O digluconato de clorexidina é um anti-séptico de largo espectro, tanto no combate de *Candida albicans* como *não- albicans* (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2000; 2001a). No entanto, embora a clorexidina apresente excelente propriedades antimicrobianas, substantividade, capacidade de reduzir a formação de biofilme e de desorganizar o biofilme pré-formado (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2001; EPSTEIN, 1990; FERRETTI et al.,1990) também apresenta alguns efeitos colaterais, incluindo leve desconforto ou sensação de ardor em contacto com a mucosa oral, esfoliação epitelial e coloração de dentes e acrílicos. Numa concentração de 2%, o gluconato de clorexidina tem sido utilizado com sucesso no tratamento de estomatite protética (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2000). Em um estudo clínico recente,

tanto a imersão em glucanato de clorexidina de 2% por 5 minutos ou 0,12% por 20 minutos, foram eficientes na redução de biofilme (ANDRADE et al., 2011).

O glutaraldeído em uma concentração de 2% também demonstrou eficácia contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Bacillus subtilis in vitro* (SILVA-LOVATO; PARANHOS, 2006). Maior eficácia desta solução contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* após 10 minutos de imersão (ANGELILLO; BIANCO; NOBILE, 1998) e mais tempo necessário para a eliminação de esporos de *Bacillus subtilis*, após 20 minutos de imersão. A principal vantagem deste produto é que ele é inativado quando em contato com a matéria orgânica, não é corrosivo e não degrada materiais plásticos, no entanto, tem potencial de toxicidade.

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3), mesmo com o uso clínico difundido, possui poucos estudos clínicos na literatura com relação à utilização como substância terapêutica na prevenção da estomatite protética. No entanto, em um estudo *in vitro* (SOUSA et al., 2009), parece ser uma alternativa viável, uma vez que reduziu significativamente a adesão de *Candida albicans* nas superfícies de resina acrílica. O bicarbonato de sódio apresenta baixa abrasão, baixo custo, relativa segurança se ingerido acidentalmente e compatibilidade com o fluoreto, o que é uma vantagem importante (NEWBRUN et al., 1997). Esta compatibilidade associada à sua eficiência contra *Streptococcus mutans* (SILHACEK; TAAKE, 2005) faz o bicarbonato de sódio uma opção para usuários de próteses parciais.

Alguns hábitos como a remoção da prótese durante a noite e a sua higiene correta com o uso diário de soluções desinfetantes são mencionados na literatura como eficazes na prevenção e tratamento de estomatite protética (BARBEAU et al., 2003; HARRISON et al., 2004; KULAK-OZKAN et al., 2002), além de trocas regulares

das próteses. Assim, estudos que avaliem a eficácia de diferentes soluções desinfetantes no controle de *Candida* deve visar encontrar uma solução padrão que apresente atividade antimicrobiana sem prejudicar a saúde do paciente ou causar alterações nas características físico-estruturais da prótese (AZEVEDO et al., 2006; PAVARINA et al., 2003).

2.2 Aspéctos Éticos

As partes 1 e 2 deste projeto de Tese serão enviados ao Comitê de Ética em Pesquisa. A parte 3 já tem parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa com parecer 140/2009.

2.3 Parte 1

2.3.1 Delineamento experimental

Estudo *in vitro* da adesão inicial de diversos microrganismos envolvidos na estomatite protética sobre superfícies de resina acrílica modificada por uma cobertura super-hidrófoba.

Este estudo *in vitro* terá um delineamento inteiramente aleatorizado e cego (material e contagem de microrganismos), considerando o tipo de material (polimetilmetacrilato - PMMA polimerizado termicamente, PMMA com superfície modificada e sem a superfície modifica (controle)) como fator do estudo. A adesão de microrganismos (*Candida*, *estreptococos do grupo mutans*, *microrganismos totais* e *lactobacilos*), rugosidade de superfície e energia livre de superfície serão as variáveis dependentes do estudo. Será utilizado saliva humana através de um modelo de biofilme de microcosmos. Este estudo será encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa da UFPel e o participante assinará o TCLE (Apêncide A). Os espécimes (n=10) serão preparados a partir resina acrílica termicamente polimerizada (Acron MC, GC America, Alsip, IL, Estados Unidos). Todas as amostras terão a sua rugosidade e energia livre de superfície avaliada anteriormente ao

ensaio de aderência. Os espécimes serão testados numa câmara de fluxo (Figura 1). Primeiro, a saliva do voluntário será inoculada na superfície das amostras por 2 h e a seguir, o meio de cultura será perfusionado para o ensaio de adesão. A contagem dos microrganismos será realizada utilizando-se meios de cultura específicos e peso do biofilme.

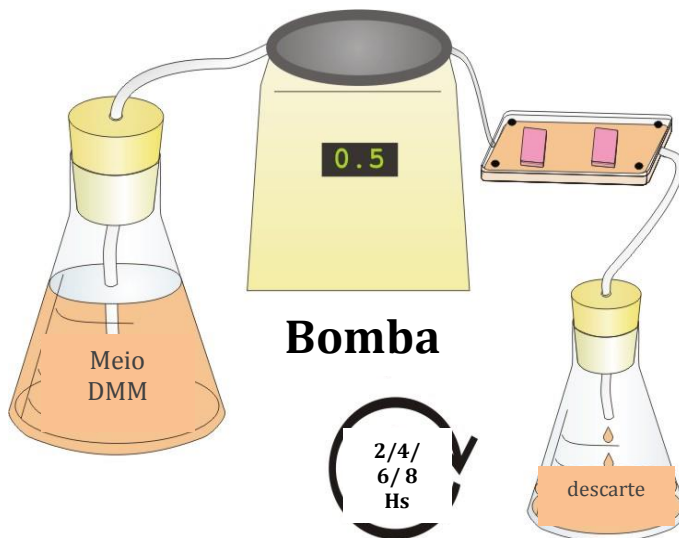


Figura 1 - Câmara de fluxo ligada à bomba peristáltica para o ensaio de adesão (VASILAS et al., 1992; NIKAWA et al., 1997; MILLSAP et al., 1999; PEREIRA-CENCI et al., 2008).

2.3.2 Preparação de resinas acrílicas

As amostras de PMMA serão preparadas a partir de resina acrílica termicamente ativada (Acron MC, GC America, Alsip, IL, Estados Unidos) (controle) por meio da técnica de compressão do molde. Inicialmente, padrões em cera serão cortados nas dimensões de 2,5 x 1,2 x 0,2 cm e depois inseridos em uma mufla, seguindo as etapas do encaixotamento tradicional de resina acrílica. Posteriormente a mufla será aberta e os espécimes em cera serão removidos, com água quente, originando os espaços para posterior inserção da resina acrílica. Após a manipulação e inserção da resina, a mufla então será fechada e o processo de polimerização realizado de acordo com as instruções do fabricante. Um lado dos espécimes passará por acabamento com lixas d'água 320, 400 e 600 e polimento com um disco

de feltro e escova de Robson com pedra pomes e branco de Espanha (BRAUN et al., 2003). As amostras de resina acrílica serão imersas em água destilada a 37 °C durante 12 h para a remoção do monômero residual (OLIVEIRA et al., 2003). Após os espécimes serão revestidos com a cobertura super-hidrófoba (fator em estudo).

2.3.3 Preparação da cobertura super-hidrófoba

Uma solução hidrófoba baseada em organo-silano será utilizada baseada em estudo prévio (OLIVEIRA, 2012): 2,5% de perfluorodecil-trietóxi-silano (Sigma-Aldrich) diluído em dimetilsulfóxido.

Após a cobertura pronta, será aplicado 3 camadas da solução na superfície do substrato (n=10) e o conjunto será aquecido (substrato/cobertura) a 150°C por 2 horas, com taxa de aquecimento de 10°C/min.

2.3.4 Rugosidade de superfície

A rugosidade de superfície (Ra) das amostras será medida utilizando um rugosímetro (SURF CORDER SE 1700 Indústria Kozaka, Kozaka, Japão), com uma resolução de 0,01 mm, comprimento calibrado a amostra de 0,8 mm, 2,4 mm de percussão medida e 0,5 mm/s. Três mensurações em diferentes locais de cada espécime serão realizadas e a média aritmética será o valor de rugosidade de superfície para o referido espécime. Após a mensuração da rugosidade de superfície, os espécimes serão submetidos à desinfecção em banho ultra-sônico durante 20 minutos (LUO; SAMARANAYAKE, 2002).

2.3.5 Energia livre de superfície

Para caracterizar as propriedades de molhamento das superfícies de resina acrílica, ângulos de contato serão medidos para cada espécime. A água será escolhida como o líquido teste (MINAGI et al., 1985; MOURA et al., 2006) (Figura 2a). A configuração experimental consistirá de uma fase ajustável em que as amostras serão colocadas e uma gota (15 uL) de água destilada desionizada será dispensada em 0 graus na superfície dos espécimes com inclinação através de uma micropipeta (MOURA et al., 2006). Fotografias das gotas serão tomadas imediatamente sob condições padrão e os ângulos de contato serão medidos (AutoCAD 2005, Autodesk Inc., EUA) (Figura 2b). O valor médio de três medições para cada superfície será usado. Energia livre de superfície será calculada (Maple 9,5, Waterloo Maple Inc., Canadá), utilizando os ângulos de contato e a seguinte equação:

$$\cos(\Theta) = -1 + \frac{2\sqrt{\gamma_l \gamma_s} \exp^{-\beta(\gamma_l - \gamma_s)^2}}{\gamma_s}$$

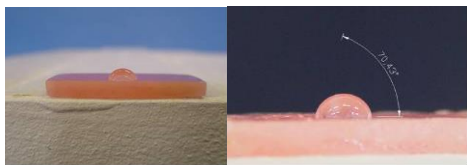


Figura 2 - Espécime de resina acrílica colocado sobre o dispositivo para captura de imagem após deposição da gota (a); Mensuração do ângulo de contato em espécime de resina acrílica para posterior obtenção da energia livre de superfície (b).

As superfícies que formarem um ângulo de contato com a água entre 90° e 150° são consideradas hidrófobas enquanto as maiores que 150° são consideradas super hidrófobas (GAO; MCCARTHY, 2006; MA; HILL, 2006).

2.3.6 Crescimento de biofilme em modelo de microcosmos

Será utilizado modelo de biofilme de microcosmos anteriormente descrito (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007; VAN DE SANDE et al., 2011). Saliva humana será utilizada como inóculo. Serão utilizados 80mL de saliva, de um doador saudável, usuário de prótese total, que não tenha utilizado antibióticos, enxaguatórios bucais ou qualquer outro medicamento conhecido por afetar microrganismos ou composição salivar e o fluxo salivar nos últimos 3 meses. A saliva será recolhida durante a estimulação mastigatória com Parafilm M (American Co., Greenwich, CT, EUA) em um tubo de Erlenmeyer esterilizado de gelo-refrigerados. Como substrato, será utilizada a resina acrílica com e sem a cobertura super-hidrófoba, dividida em 2 grupos (n= 10 amostras por grupo), os quais serão alocados em tempos de avaliação para adesão inicial de microrganismos: 2, 4, 6 e 8 hrs. As resinas serão pesadas em conjunto com microtubos estéreis (peso inicial). O biofilme de microcosmos crescerá sobre as resinas em meio definido enriquecido com mucina com glicose a 1%.

As resinas serão transferidas assepticamente para uma câmara conectada à bomba peristáltica dentro de uma câmara de fluxo laminar para evitar contaminação e 0,4 mL de saliva fresca e homogeneizada será dispensada sobre cada resina. Após 2h a 37°C, a saliva será delicadamente aspirada e meio de cultura (DMM) será perfusionado através de bomba peristáltica a 0,5 mL/min em anaerobiose, com a utilização de gás injetado no reservatório do sistema e mantidas a 37°C por até 8h, conforme condição experimental.

Após a perfusão do meio de cultura por determinado tempo, o fluxo será trocado para tampão PBS, a fim de remover os microrganismos não aderentes da

câmara e dos tubos do sistema. As amostras serão removidas e imediatamente colocadas nos tubos pré-pesados para a análise microbiológica.

2.3.7 Análise microbiológica

Para análise microbiológica os espécimes coletados serão acondicionados em tubo para microcentrifuga, onde será adicionado 1mL de solução de NaCl a 0,9% esterilizada e este conjunto será sonificado. A seguir, as amostras serão normalizadas por peso seco. O peso seco consiste no peso inicial do eppendorf, antes da colocação da solução e do espécime, subtraído pelo peso final do biofilme, após centrifugação. A parte da suspensão restante será diluída serialmente até a proporção de 1:100.000.000 (10^{-7}) em solução salina. As diluições serão semeadas em placas de petri contendo os meios de cultura: a) mitis salivarius bacitracina (MSB), contendo 0,2 unidades de bacitracina/mL e 0,001% de telurito de potássio, para determinação de estreptococos do grupo mutans (diluição 10^{-5}); b) Meio Agar sangue, para determinação dos microrganismos totais (diluição 10^{-7}); c) Meio CHROMagar *Candida* para determinação de espécies de *Candida* (diluição 10^{-4}); d) Meio Agar Rogosa, para determinação de lactobacilos (diluição 10^{-4}).

Neste estudo os *estreptococos do grupo mutans*, os *lactobacilos* e as espécies de *Candida* serão as selecionadas porque aderem a superfícies duras na cavidade bucal, como dentes ou próteses, e estão envolvidas na formação e acúmulo de biofilme sobre as superfícies mencionadas (CARLSSON et al., 1969). Em acréscimo, deve ser destacado que essas bactérias correspondem a um terço de todas as espécies encontradas no biofilme de próteses (NYVAD; KILIAN, 1987).

2.3.8 Contagem de microrganismos

A contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) será expressa em UFC/mg biofilme. Além disso, a porcentagem de *estreptococos do grupo mutans*, *lactobacilos* e cada espécie de *Candida* em relação aos *microorganismos totais* viáveis do biofilme serão calculados. Para a contagem das colônias, um microscópio estereoscópico será utilizado; colônias atípicas (nos meios para lactobacilos, estreptococos do grupo mutans) serão identificadas através de coloração de Gram e bacterioscopia. Utilizando a seguinte equação:

$$[X = (n^2) \cdot 5 \cdot 10^{n+1}]$$

n^2 = nº de colônias contadas

n = diluição

x = resultado em UFC

2.3.9 Análise estatística

Valores médios de rugosidade e de energia livre de superfície serão analisados por análise de variância. Os dados da contagem de colônias serão submetidos à análise estatística e os pressupostos de homogeneidade de variância e a distribuição normal dos erros serão testados para resposta testada, utilizando-se $p < 0,05$.

2.4 Parte 2

O desenvolvimento deste experimento somente ocorrerá se os resultados encontrados no estudo *in vitro* (Parte 1) forem favoráveis, ou seja, se a superfície modificada resultar em diminuição da adesão inicial de microrganismos.

2.4.1 Delineamento experimental

Estudo *in situ* da formação de diversos microrganismos envolvidos na estomatite protética sobre superfícies de resina acrílica modificada por uma cobertura super-hidrófoba.

Este estudo será um estudo clínico *in situ*, randomizado e cego com formação de biofilme de até 07 dias, com delineamento de acordo com o CONSORT (2010). Serão convidados a fazer parte do estudo 10 voluntários usuários de prótese total superior, com indicação para substituição, sendo portadores do microrganismo *Candida*, avaliado por um *screening* inicial para verificar a presença do microrganismo, os participantes assinarão o TCLE (Apêndice B). O cálculo do número de pacientes a serem incluídos no estudo, para detectar uma redução na formação de biofilme, foi baseado no estudo de OLIVEIRA (2012), na ordem de 37% devido ao uso da cobertura super-hidrofóbica sobre os espécimes, foi usado o nível de significância de 5% e um poder de 80% para chegar a um tamanho de amostra de 8 (oito) indivíduos por grupo. Mais 2 (dois) indivíduos por grupo serão recrutados para evitar perdas ou desistências, resultando em n=10. Considerando perda de 10%. Os espécimes serão feitos com PMMA com modificação ou não de superfície, conforme Parte 1 da tese. Os espécimes serão mensurados previamente quanto a rugosidade e energia livre de superfície. Este estudo será encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa da UFPel .

Serão inseridos na prótese total superior antiga dos voluntários de forma randomizada através do programa Microsoft Office Excel, 12 espécimes de resina acrílica termopolimerizável, 6 modificadas com uma cobertura super-hidrófoba e 6 espécimes de resina acrílica termopolimerizável (controle) (Figura 3). Após 24 h, 48h e 7 dias, tanto o biofilme formado como os espécimes serão removidos em

duplicata, sendo o biofilme usado para análise microbiológica e os espécimes para reavaliação de sua rugosidade de superfície e energia livre de superfície. Terminado o estudo *in situ*, os voluntários receberão próteses novas superiores e inferiores.

2.4.2 Seleção dos voluntários

Serão selecionados 10 voluntários que atendam os critérios de inclusão:

1. Adultos saudáveis portadores de prótese total superior com indicação para substituição;
2. Que não apresentem histórico de uso de antifúngicos, antibióticos, medicamentos para xerostomia ou anti-sépticos bucais nos últimos 03 meses;
5. Tenham disponibilidade para comparecerem a FO/UFPel nos dias pré-determinados;
6. Concordem com o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FO/UFPel.

Critérios de exclusão:

1. Pacientes com doenças sistêmicas não controladas, portadores de diabetes mellitus ou que façam uso de antibióticos ou medicação que sabidamente diminuam o fluxo salivar;
2. Pacientes que não forem portadores do fungo *Candida* residente;
3. Pacientes que não forem usuários de prótese total superior.

2.4.3 Screening para a presença de *Candida*

Para se certificar da presença do microrganismo *Candida* na cavidade bucal será feito um *screening* inicial coletando biofilme do palato com o auxílio de *swab* e semeado em placas CHROMagar *Candida* incubadas em aerofilia a $37 \pm 1^\circ \text{C}$

durante 24 horas para verificar a presença do microrganismo. Os voluntários que não apresentarem resultados positivos para a presença do microrganismo *Candida* serão excluídos do estudo mas serão encaminhados para clínicas de referência (UPDIII) para confecção de novas próteses.

2.4.4 Preparo dos espécimes

Os espécimes de resina acrílica termicamente polimerizada sem cobertura super-hidrófoba (controle) (Acron MC, GC America, Alsip, IL, Estados Unidos) serão proporcionados e manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes para a confecção de espécimes nas dimensões de 0,5 x 0,5 x 0,2 cm. Receberão acabamento e polimento e terão suas superfícies modificadas (superfície super-hidrófoba) conforme o projeto *in vitro*. Os espécimes com superfície modificada (superfície super-hidrófoba) serão preparados de acordo com a metodologia descrita no Parte 1 nas mesmas dimensões que o controle acima descrito.

2.4.5 Rugosidade e energia livre de superfície

A rugosidade e energia livre de superfície serão mensuradas conforme protocolo descrito na Parte 1.

2.4.6 Inserção dos espécimes na prótese

A prótese total antiga de cada voluntário (as usadas pelo paciente quando o mesmo será selecionado) será limpa com jato de óxido de alumínio para remoção de cálculo e biofilme aderidos à superfície. Posteriormente a prótese será polida com escova e pedra-pomes, disco de feltro e branco de Espanha, nesta ordem. Desta forma, todos os aparelhos protéticos apresentarão as mesmas condições

superficiais de lisura e limpeza, para que este aspecto não interfira nos resultados deste estudo. Após acabamento e polimento dos espécimes, estes serão imediatamente colocados nas próteses antigas dos pacientes para simular o uso clínico (BOSCATO et al., 2010).

Seis espécimes de cada lado da prótese (seis espécimes resina acrílica termicamente polimerizada (controle) (Acron MC, GC America, Alsip, IL, Estados Unidos) e seis espécimes resina acrílica com cobertura super-hidrófoba serão fixados com cera pegajosa em um recesso medindo 0,6 x 0,6 x 0,2 cm previamente preparado na região palatina, correspondente à localização dos pré-molares e molares da prótese (vertente palatina do rebordo alveolar) (Figura 3). Os recessos inicialmente serão desenhados com lápis na região padronizada da base da prótese onde posteriormente com o auxílio de micromotor, peça reta e fresa apropriada, será realizado cavidades nas delimitações dos desenhos. Estes recessos estarão na parte interna da prótese total, diretamente em contato com o palato. Este local será escolhido porque esta região de palato e prótese superior são os locais de maior prevalência destes fungos (VANDEN ABBEELE et al., 2008). Após realizados os procedimentos acima descritos, as próteses serão devolvidas aos voluntários, e estes utilizarão as suas próteses normalmente.

Os voluntários se alimentarão normalmente e dormirão com as próteses (SHEEN; HARRISON, 2000), removendo as mesmas 3x/dia para higienização (PARANHOS et al., 2007; SILVA-LOVATO et al., 2010). Não será permitida a utilização de quaisquer enxaguatórios ou medicamentos durante as duas fases do estudo. Eventualmente se algum voluntário relatar tal uso, o mesmo será automaticamente excluído do estudo.

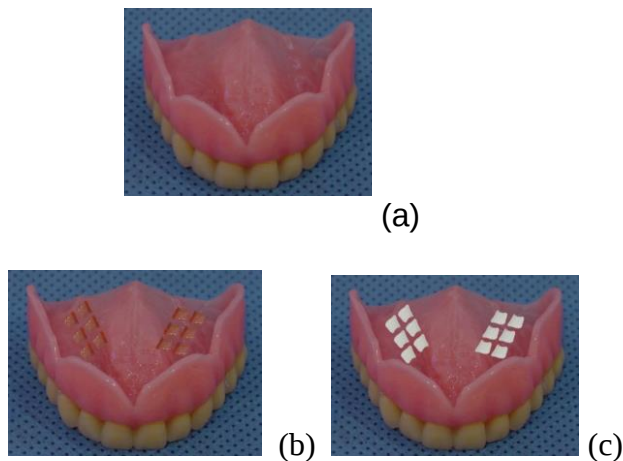


Figura 3 - Adequação das bases da prótese (a); esquema dos recessos para colocação dos espécimes (b) espécimes inseridos nos recessos na região palatina de uma prótese total superior (c).

Todos os voluntários receberão instruções impressas de higiene oral, cuidados com as próteses e esclarecimentos sobre a pesquisa (Apendicê E).

2.4.7 Coleta do material

Decorridos os tempos de 24 h, 48 h e 7 dias, dois espécime de cada material (resina acrílica com superfície super hidrófoba e resina acrílica controle) serão coletado em duplicata com auxílio de espátula estéril e depositado em tubos para microcentrífuga previamente esterilizados, os tubos serão mantidos em banho de gelo até o processamento. Os recessos serão limpos e preenchidos com cera utilidade.

Ao final do experimento, os recessos das próteses serão preenchidos com resina acrílica auto polimerizável que passará por acabamento e polimento. Os voluntários em momento algum ficarão sem usar sua prótese. Após finalizarmos a pesquisa prosseguiremos a sequência clínica para confecção de nova prótese total superior e inferior.

2.4.8 Análise microbiológica

Os espécimes coletados serão acondicionados em tubo para microcentrifuga, onde será adicionado 1mL de solução de NaCl a 0,9% esterilizada e este conjunto será sonificado. A seguir, as amostras serão normalizadas por peso seco. O peso seco consiste no peso inicial do eppendorf, antes da colocação da solução e do espécime, subtraído pelo peso final do biofilme, após centrifugação.

A parte da suspensão restante será diluída serialmente até a proporção de 1:100.000.000 (10^{-7}) em solução salina. As diluições serão semeadas em placas de petri contendo os meios de cultura: a) mitis salivarius bacitracina (MSB), contendo 0,2 unidades de bacitracina/mL e 0,001% de telurito de potássio, para determinação de estreptococos do grupo mutans (diluição 10^{-5}); b) Meio Agar sangue, para determinação dos microrganismos totais (diluição 10^{-7}); c) Meio CHROMagar *Candida* para determinação de espécies de *Candida* (diluição 10^{-4}); d) Meio Agar Rogosa, para determinação de lactobacilos (diluição 10^{-4}).

A semeadura será realizada pela deposição de alíquotas (20 μ L) destas diluições em duplicata nas placas. As placas de CHROMagar *Candida* serão incubadas em estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h. As placas de MSB, Rogosa, e Ágar sangue serão incubadas em estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 h, em atmosfera anaeróbica. As unidades formadoras de colônia (UFC) serão contadas, e os resultados serão expressos em UFC/mg biofilme. Além disso, será calculada a porcentagem de estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e cada espécie de *Candida* em relação aos microrganismos totais viáveis do biofilme. Para a contagem das colônias, um microscópio estereoscópico será utilizado; colônias atípicas serão identificadas através de coloração de Gram e bacterioscopia.

Após a obtenção dos resultados, os mesmos serão tabulados e submetidos à análise exploratória dos dados. A escolha do teste estatístico a ser utilizado dependerá da homogeneidade dos resultados. O nível de significância de 5% será utilizado nas análises.

2.5 Parte 3

2.5.1 Delineamento experimental

Este estudo será um ensaio clínico controlado, cruzado e randomizado e triplo cego (paciente, operador clínicos, e análise de biofilme) com tipo de limpador como fator em estudo. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa protocolo 140/2009 (Anexo A). A saúde bucal dos voluntários será avaliada e todos os participantes assinarão o TCLE (Apêndice C). Serão selecionados 24 pacientes usuários de prótese total superior em boas condições clínicas. O desenho do estudo clínico randomizado será realizado conforme o CONSORT (2010). Os voluntários serão divididos aleatoriamente em 4 sub-grupos. Durante 4 fases de 14 dias, os voluntários utilizarão um dos 4 tratamentos para higienização de suas próteses, dependendo da aleatorização. O biofilme formado será corado e será realizada análise da composição microbiológica do mesmo.

2.5.2 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários

Serão chamados a participar do estudo, os pacientes recentemente reabilitados na disciplina de Prótese Dentária da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, entre um e dois anos de uso da prótese total superior. O número de voluntários para cada grupo experimental foi $n=24$, cálculo este realizado a partir de publicações prévias que testaram protocolos de

higienização de prótese com delineamento semelhante (SHEEN; HARRISON 2000), foi usado o nível de significância de 5% e um poder de 95%.

Fórmula do calculo amostral:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Onde:

n= amostra calculada

N= população

Z= variável normal padronizada associada ao nível de confiança

p= verdadeira probabilidade do evento

e= erro amostral

Estes serão examinados, selecionados de acordo com a proposta da pesquisa, esclarecidos sobre a mesma e convidados a participarem do projeto de pesquisa. Esses voluntários responderão um questionário semi-aberto a fim de se obter dados sociais destes, para posterior correlação e dados sobre fatores extrínsecos atuantes, como por exemplo o tabagismo (Apêndice D).

Serão selecionados os voluntários que atendam aos seguintes critérios de inclusão:

1. Voluntários saudáveis, que utilizem prótese total superior sem necessidade de substituição, que foram reabilitados recentemente na FO/UFPeI (entre um e dois anos de uso)
2. Tenham disponibilidade para comparecerem a FO/UFPeI nos dias pré-determinados;
3. Concorde com o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FO/UFPeI;

4. Não apresentar histórico de uso de antifúngicos, antibióticos, medicamentos para xerostomia ou anti-sépticos bucais nos últimos 03 meses;

Serão excluídos do estudo indivíduos com limitada atividade motores ou com doenças sistêmicas que impossibilitem o indivíduo de participar do estudo, como por exemplo, pacientes com candidíase, os quais imediatamente receberão tratamento.

2.5.3 Adequação das próteses e divisão dos grupos experimentais

Para evitar que a quantidade de biofilme inicial dos voluntários selecionados fosse despadronizada antes do início do estudo, os indivíduos serão incluídos se o escore de placa inicial observado na base da prótese total for maior que 1 (1 a 25% de cobertura de biofilme (SHEEN; HARRISON, 2000)). Após a adequação inicial da prótese, no tempo baseline (To) as próteses serão coradas e fotografadas para quantificação de biofilme inicial, correspondente ao baseline. As próteses usadas por cada voluntário serão limpas com escova de robson e pedra pomes. Um período de 7 dias de “run-in” antes do experimento será realizado para que os voluntários acostumem-se com o protocolo. Serão fornecidas escova e pasta dental e um recipiente para “treinamento” do protocolo, onde os sujeitos deverão imergir suas próteses em água por 10 minutos, seguido de escovação, a qual será mostrada durante a consulta. Os indivíduos utilizarão suas próteses durante a noite (SHEEN; HARRISON, 2000).

2.5.4 *Screening* para a presença de *Candida*

Para se certificar da presença do microrganismo *Candida* na cavidade bucal será feito um *screening* inicial coletando biofilme do palato com o auxílio de *swab* e semeado em placas CHROMagar *Candida* incubadas em aerofilia a $37 \pm 1^\circ \text{C}$

durante 24 horas para verificar a presença do microrganismo. Os voluntários que não apresentarem resultados positivos para a presença do microrganismo *Candida* serão excluídos do estudo mas serão encaminhados para clínicas de referência (UPDIII) para confecção de novas próteses.

2.5.5 Padronização da higienização química e mecânica

Os voluntários receberão instruções de higiene bucal através da Técnica diga-mostra-faça. Onde primeiramente iremos falar como deverá ser feito a higienização mecânica da prótese, a qual deverá ser realizada 3 vezes ao dia, após cada refeição, todos os voluntários receberão as mesmas instruções impressas de higiene bucal (Apêndice F). Seguindo pela demonstração prática da técnica e finalizando com cada voluntário demonstrando como aprendeu que deve ser feito a correta higienização da prótese. Eles também serão instruídos a lavar a cavidade bucal, com bochecho de água da torneira depois da escovação (ANDRADE et al., 2011), bem como lavar as próteses com água da torneira após o período de imersão das mesmas.

As soluções serão colocadas em potes âmbar de mesmo tamanho e formato, para que se tenha o cegamento do pesquisador, bem como os agentes de limpeza serão fornecidos pelos pesquisadores. Após 7 dias, será realizada a análise descrita a seguir e os voluntários aguardarão por um período de *wash-out* de 7 dias para alocação no próximo grupo experimental, caracterizando-se assim um ensaio cruzado, no qual o voluntário passará por todos os tratamentos. Ainda, receberão impresso o protocolo de imersão juntamente com o dia da semana pré-estipulado para a imersão das próteses, assim será determinado, visando padronizar e delimitar que a imersão realmente só será feita 1 vez por semana.

Após a evidenciação de biofilme no *baseline* os indivíduos serão alocados em quatro grupos experimentais de forma randomizada, utilizando-se envelope pardo lacrado (preparado por um pesquisador que não atuará nesta pesquisa) contendo em seu interior, o número do grupo ao qual foi designado de acordo com a substância e proposta de protocolo aplicado, conforme descrição a seguir:

Grupo 1: realizarão três vezes ao dia a higiene bucal mecânica (PARANHOS et al., 2007; SILVA-LOVATO et al., 2010), com uma escova macia e dentífrico, fornecidos pelos pesquisadores. Receberão também solução aquosa sem qualquer princípio ativo para imersão de suas próteses 1 (uma) vez por semana (placebo).

Grupo 2: higiene diária mecânica conforme G1 e os pacientes serão orientados a imergir a prótese em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % durante 10 minutos (BELL et al., 1989; SILVA et al., 2009; FERREIRA et al., 2009), 1 (uma) vez por semana.

Grupo 3: higiene diária mecânica conforme G1 e os pacientes serão orientados a imergir suas próteses em solução de clorexidina 0,12% durante 10 minutos (SOUSA et al., 2009), 1 (uma) vez por semana.

Grupo 4: higiene diária mecânica conforme G1 e os pacientes serão orientados a imergir suas próteses em solução de bicarbonato de sódio 5% durante 10 minutos (SOUSA et al., 2009), 1 (uma) vez por semana.

2.5.6 Critérios de avaliação / Análises a serem conduzidas.

2.5.6.1 Desfechos primários

1. Cobertura de biofilme avaliada por métodos objetivos.
2. Contagem microbiológica em tecidos moles, prótese e saliva (com auxílio de swab).

2.5.6.2 Desfechos secundários

(1) Saúde das áreas cobertas pelas próteses: i. Tecidos moles e mucosas (áreas edemaciadas, vermelhas, com micro ou macropápulas, apresentando sangramento) Estes aspectos serão avaliados clinicamente e registrados através de imagens fotográficas.

(2) Satisfação dos pacientes e/ou preferencia: através de um questionário (Apêndice G)

2.5.6.3 Efeitos adversos

i. Aparência da prótese (exemplo: manchas, alteração de cor): através de um colorímetro (HONG et al., 2009). Este sistema baseia-se em 3 parâmetros para a definição de cor: L^* , a^* e b^* . L^* representa o grau de brilho e luminosidade, a^* representa um vermelho-verde, e b^* representa amarelo-azul. A mudança de cor (ΔE) de cada prótese será calculada com o uso da fórmula abaixo (WYSZECKI; STILES, 1982):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Onde a^* e b^* são na escala cromática representado pelo vermelho como $+a^*$ e verde como $-a^*$, enquanto corresponde para o amarelos $+b^*$ e azul para $-b^*$. Delta L^* , Δa^* , e Δb^* representam as diferenças medidas para L^* , a^* , b^* (HONG et al., 2009)

ii. hipersensibilidade ou reações adversas aos fármacos (exemplo: gosto ruim): através de um questionário (Apêndice G)

2.5.7 Análise do acúmulo de biofilme

Em cada tempo de avaliação (T0, T7 e T14) para os diferentes grupos, as próteses serão coradas com substância Replak (Dentsply Ind. e com Ltda), escolhido por apresentar boa capacidade de corar biofilme e facilidade de remoção da prótese dentária, além do poder de diferenciar cálculo da placa bacteriana através da coloração azul e rosa (claro a escuro), respectivamente (LOVATO et al., 2000), este passará por uma avaliação prévia, através de um protocolo piloto, para avaliar a segurança do corante quanto a viabilidade microbiológica após a exposição do biofilme ao corante. O corante permanecerá durante 1 min na superfície. Em seguida, as próteses serão lavadas em água corrente e avaliadas quanto à presença de biofilme nas regiões previamente estabelecidas para análise: superfície interna das próteses superiores, gengiva artificial, dentes artificiais anteriores e posteriores (Tabela 1).

Para quantificação do biofilme, serão empregados métodos baseados nos índices propostos por AMBJORSEN et al. (1984) , sendo os critérios adaptados às áreas da prótese total selecionada para avaliação (Tabela 2), e dividida em quadrantes as regiões estabelecidas para avaliação, aplicando-se, através de uma análise qualitativa, os escores correspondentes. Imagens digitais de alta resolução, padronizadas quanto à distância e foco, serão realizadas por um operador previamente treinado, utilizando uma máquina fotográfica. Serão capturadas imagens de cada prótese total superior corada (SHEEN; HARRISON, 2000), nos tempos T0, T7 e T14. As áreas coradas incluirão todas as regiões da prótese total superior: (i) região vestibular (frontal, esquerda e/ou direita), (ii) superfície interna em ângulo de 90. Uma (1) foto de cada ângulo (SHEEN; HARRISON 2000), sendo quatro (1) sobre a superfície vestibular, e quatro (1) sobre o palato (Figura 4). Cada

imagem será analisada através das contagens dos pixels formados nas áreas coradas da base de prótese, que serão projetadas em uma tela com dimensões de 1m x 1m. Cada quadrado de 10 cm x 10 cm preenchido por uma superfície corada representará 1% da área total da superfície (SHEEN; HARRISON 2000; BOSCATO et al., 2009)

Tabela 1- Método de avaliação pré-evidenciação (DAVID et al.,1981; SHEEN; HARRISON, 2000).

Escore	Critério	Descrição
0	Biofilme ausente	Ausência de biofilme visível
1	Leve acúmulo de Biofilme	Até 25% da superfície da prótese coberta por biofilme – prótese fracamente corada
2	Moderado acúmulo de biofilme	Até 50% da superfície da prótese coberta por biofilme – prótese moderadamente corada
3	Intenso acúmulo de biofilme	> 50% da superfície da prótese coberta por biofilme – prótese intensamente corada

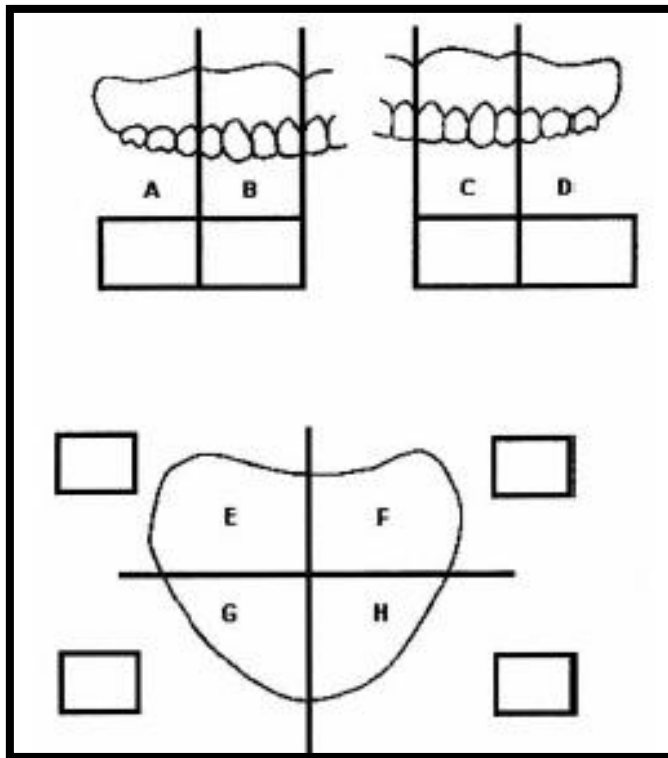


Figura 4 - Método visual para padronização das imagens radiográficas (AUSBERGER; ELAHI, 1982.; SHEEN; HARRISON, 2000).

Tabela 2- Método de avaliação pós-higienização (DAVID et al.,1981; SHEEN; HARRISON, 2000).

Escore	Critério	Descrição
0 Muito eficiente	100% de remoção de biofilme	Intensidade diminuiu de SIM para NÃO corado
1 Eficiente	75% de remoção de biofilme	Intensidade diminui de +/- para NÃO corado
2 Parcialmente Corado	50% de remoção de biofilme	Intensidade diminui de SIM para +/- corado
3 Ineficiente	< 25% de remoção de biofilme	A Intensidade não alterou o processo de higienização

2.5.8 Análise microbiológica

O biofilme formado será coletado com microbrush e diluído serialmente. As diluições serão semeadas em placas de petri contendo os meios de cultura: a) mitis salivarius bacitracina (MSB), contendo 0,2 unidades de bacitracina/mL e 0,001% de telurito de potássio, para determinação de estreptococos do grupo mutans (diluição 10^{-5}); b) Meio Agar sangue, para determinação das microrganismos totais (diluição 10^{-7}); c) Meio CHROMagar *Candida* para determinação de espécies de *Candida* (diluição 10^{-4}); d) Meio Agar Rogosa, para determinação de lactobacilos (diluição 10^{-4}).

A semeadura será realizada pela deposição de alíquotas (20 μ L) destas diluições em duplicata nas placas. As placas de CHROMagar *Candida* serão incubadas em estufa a 37 ± 1 °C por 48h. As placas de MSB, Rogosa, e Ágar sangue serão incubadas em estufa a 37 ± 1 °C por 72 h, em atmosfera anaerobiose. As unidades formadoras de colônia (UFC) serão contadas, e os resultados serão expressos em UFC/mg biofilme. Além disso, a porcentagem de estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e cada espécie de *Candida* em relação aos microrganismos totais viáveis do biofilme serão calculadas. Para a contagem das colônias, um microscópio estereoscópico será utilizado; colônias atípicas serão identificadas através de coloração de Gram e bacterioscopia.

2.5.9 Análise estatística

Os dados serão submetidos à análise estatística e os pressupostos de homogeneidade das variâncias e a distribuição normal dos erros serão testados para resposta testada.

2.6 Orçamento e recursos

2.6.1 Recursos humanos

Para o referente estudo serão dispostos um (03) aluno de pós-graduação responsável pelo desenvolvimento do projeto, dois (02) acadêmicos que ajudarão na execução do projeto; um (01) professor orientador, que se responsabiliza pela seriedade do estudo e pela execução do projeto; dois (02) professores co-orientadores responsáveis pela orientação dos acadêmicos e execução cada qual de uma parte do projeto.

2.6.2 Recursos financeiros

Para a execução do projeto serão utilizados recursos financeiros provenientes dos próprios pesquisadores (Edital Universal CNPq 2011 e 2012) (Tabela 3).

2.7 Equipamentos

Os equipamentos a serem utilizados neste trabalho estão detalhados na Tabela 4 abaixo.

2.8 Cronograma de execução

As etapas de execução do presente estudo serão:

1. Levantamento bibliográfico inicial;
2. Qualificação do Projeto de Tese
3. Seleção e *screening* de pacientes;
4. Definição da metodologia e teste de equipamentos;
5. Execução dos testes experimentais;
6. Recolhimento e análise estatística dos resultados obtidos;

7. Levantamento bibliográfico adicional;
8. Redação de relatórios e artigo para publicação;
9. Divulgação em congressos e/ou seminários;
10. Defesa da Tese.

O cronograma de execução das etapas está detalhado na Tabela 5.

Tabela 3- Orçamento

Projeto	Item	Valor
Parte 1 (In vitro)	Resina Acrílica Termopolimerizável	90,00
	Cobertura super-hidrófoba	200,00
	Tubos Falcon 15 e 50 mL	50,00
	Placa de Petri descartável	500,00
	Alça digital de plástico estéril e descartável (0,01 mL)	300,00
	para semeadura dos microrganismos	-
	Ponteiras para pipeta 0 – 200	400,00
	Ponteiras 100 -1000	100,00
	Tubos para microcentrífuga	200,00
	Lixas d'água número 320, 400 e 600	50,00
	Swab	30,00
	Meio de cultura Blood Agar base	250,00
	Meio de cultura MSB	250,00
	Meio de cultura Agar Rogosa	250,00
	Meio de Cultura CHROMagar	250,00
	Total:	2.920,00
Parte 2 (In situ)	Itens da parte 1	2.920,00
	Broca esférica	30,00
	Materias para polimento	80,00
	Escova de dente e dentifrício	25,00
	Materias para confecção das próteses (alinato, godiva, Impregum, dentes de estoque)	5.000,00
	Total:	8.055,00
Parte 3 (In vivo)	Itens da parte 1	2.920,00
	Materiais de Polimento	80,00
	Materiais de escritório e impressão	350,00
	Escova de dente e dentifrício	200,00
	Soluções de limpeza	400,00
	Corantes	300,00
	Total:	4.250,00
Projeto de doutorado	Total:	15.225,00

Tabela 4- Equipamentos

Equipamento	Fabricante
Mufla Metálica	Dental Campineira
Vibrador para Gesso	Dental Campineira
Espatulador de Gesso a vácuo	Dental Campineira
Agitador Orbital TE-420	Tecnal
Estufa para Esterilização	Fanem
Gerador de anaerobiose	
Jarras para anaerobiose	Jouan
Rugosímetro Surf Corder SE 1700	Kozakalab
Agitador de tubos AP 56	Phoenix
Sonicador	Bausch & Lomb
Pipeta 0-200	Gilson
Pipeta 100-1000	Gilson
Câmera Fotográfica Cybershot 707	Sony
Câmera de Fluxo	

Tabela 5- Cronograma de execução das etapas

2012											
Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
						1	1	1	2	3	3
2013											
Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
4	4	4,5	3,4	3, 4	3,4	4,5	5	5	5	4	4
2014											
Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
5	5	5	6	6	6	6	7	7,8	7	7	7
2015											
Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
7	7	7,8	7	10							

3 Relatório de Trabalho de Campo

3.1 Aspectos éticos

O projeto desenvolvido, PARTE 3, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPe/ RS) sob parecer nº140/2009 (Anexo A). Os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, a fim de autorizar sua participação no estudo (Apêndice A).

3.2 Condições gerais

Devido à inviabilidade de executar confecção da superfície super-hidrófoba em tempo hábil. Não foi possível executar o projeto PARTE1 e conseqüentemente o PARTE 2, pois este dependia dos resultados do primeiro para ser desenvolvido.

Para o estudo clínico randomizado, foram selecionados 40 voluntários, usuários prótese total superior entre um e dois anos de uso. O estudo foi completamente cego (quanto à análise microbiológica) e aleatorizado. O desenho do estudo foi cruzado e descrito conforme o CONSORT. Os voluntários foram divididos aleatoriamente em 4 sub-grupos. Durante 4 fases de 14 dias, utilizando 4 diferentes tratamentos para higienização de suas próteses, dependendo da aleatorização. O biofilme formado na parte interna de um dos lados da prótese e na região vestibular dos pré-molares foi coletada em cada tempo (7 e 14 dias) para a análise e comparação microbiológica do mesmo. Ainda, em cada tempo observado as próteses também foram coradas por 1 minuto e fotografadas para posterior análise.

Destes, dois voluntários foram perdidos devido ao uso de antibiótico e necessidades cirúrgicas, resultando em trinta e oito pacientes (n=38). Para aqueles com a doença (Estomatite por dentadura), os quais foram excluídos do estudo, todos receberam terapia antifúngica com Fluconazol 150 mg dose única e Nistatina creme 3 vezes ao dia (SAMARANAYAKE et al., 2009; CANNON; FIRTH, 2006; NININ et al., 2010). Além de instrução de higiene com escova de dente macia e pasta de dente convencional, usada tanto na higiene da prótese como para higiene de tecidos moles de língua da cavidade oral. Foi instruído a desinfecção através da imersão em solução hipoclorito de sódio a 0,5% durante 10 minutos a cada 4 dias (FERREIRA et al., 2009). Todos os voluntários foram acompanhados durante 3 meses para avaliar a remissão total dos sinais clínicos da inflamação.

3.3 Rotinas laboratoriais

3.3.1 Coleta e processamento

Decorridos os tempos de 7 e 14 dias, o biofilme formado em um dos lados da parte interna da prótese e na região vestibular dos pré-molares foi coletado com o auxílio de um microbrush estéril, em uma área pré determinada, através de um molde feito por uma matriz metálica (2cm por 2 cm), e depositados em eppendorfs previamente esterilizados, contendo 1mL de solução de NaCl a 0,9%, os eppendorfs foram mantidos em banho de gelo até o processamento. Este conjunto foi sonificado e diluído para o plaqueamento nos meios de cultura.

As fotografias foram feitas após as próteses serem coradas por 1 minuto e lavadas com água corrente (no lado oposto aos da coleta do biofilme). As imagens foram feitas com uma câmera (Canon EOS Digital Rebel Canon Inc., Tokyo, Japan) em um ângulo de 90° em relação à prótese, nos tempos baseline, 7º dia e 14º dia.

Decorridos 07 dias de intervalo (*washout*), os mesmos voluntários participaram das próximas fases do experimento (total de 4 fases). Foram 77 dias de experimento (4 fases de 14 dias cada) com 3 semanas de intervalo. Todos os pacientes receberam padronização de suas próteses com escova de Robson e pedra pomes, além de polimentos com uma sequência de borrachas específicas para acrílico, antes do início do experimento. Aqueles pacientes que possuem dentes no arco inferior e/ou prótese removível inferior também passaram pela padronização. A cada término de uma das fases testes, era feito novamente o protocolo de padronização (baseline).

3.3.2 Protocolo de obtenção do biofilme

Os pacientes foram instruídos a higienizar suas próteses três vezes ao dia (manhã, tarde e noite) e fazer a imersão da prótese 1 vez por semana durante 10 minutos. Não houve restrições alimentares e foram orientados a permanecer com as próteses em boca durante 24 horas por dia, já que todos relataram não removê-las à noite. No dia das coletas eles foram orientados a não comer e nem higienizar a prótese por pelo menos 1hs antes da coleta.

O biofilme coletado foi colocado em eppendorfs contendo 1 mL de solução salina estéril, sonificados (Sonicador UNIQUE, Indaiatuba, SP, Brasil) com potência de 30W, amplitude de 5%, com 3 pulsos de 10 segundos cada, para obtenção do biofilme em suspensão homogênea. Em seguida, as suspensões de biofilme eram diluídas serialmente e plaqueadas em meios de cultura para contagem de estreptococos do grupo mutans, lactobacilos, espécies de *Candida* e *Microrganismos totais* (CENCI, 2008.; TENUTA et al., 2006).

Do lado oposto a coleta, o biofilme foi corado por 1 minuto, lavado e fotografado. E as imagens obtidas foram armazenadas para posterior análise.

3.4 Alterações no projeto original

3.4.1 Dificuldades encontradas

A primeira dificuldade encontrada foi conseguir todos os voluntários para participar do experimento, no nosso estudo em especial, foi ainda mais difícil porque todos os voluntários já deveriam ter suas próteses novas, portanto, a grande maioria dos voluntários não tinham paciência de continuar indo na faculdade por mais 3 meses, uma vez por semana. Ainda, após as sugestões da banca decidimos acrescentar 16 voluntários no projeto, totalizando 40 voluntários. Desta forma, o número de voluntários passou de 24 para 40. Considerando assim, um poder maior para o estudo.

Após conseguimos selecionar os 40 voluntários (que se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão do nosso estudo, que aceitaram participar, da pesquisa e assinaram o TCLE), todos passaram pela adequação e padronização das suas próteses no tempo baseline (To) com escova de Robson e Pedra Pomes, seguidos pela sequência de polimento. Para aqueles que possuíam dentes no arco inferior foi feita adequação bucal, raspagem e alisamento radicular e ainda limpeza e padronização das próteses inferiores mesmo que não entravam no estudo. Para aqueles que a prótese não estava confortável foi feito ajustes e reconsultas até que todos estivessem com o mesmo padrão de adaptação e higiene. Todos receberam escova, pasta de dente e solução placebo (água) para executar um piloto antes no início do experimento.

Porém, para nossa surpresa, após todas essas etapas feitas e concluídas, quando estávamos com tudo pronto para dar início ao experimento clínico, fomos avisados, através da solicitação da professora da disciplina de prótese total, que trinta (30) dos nossos voluntários estariam participando de outro estudo na disciplina de prótese total, e, portanto, não estavam liberados a participar de outro estudo. Diante disso, os trinta voluntários foram chamados, esclarecidos do ocorrido, orientados a procurar a disciplina de prótese total e automaticamente excluídos do estudo. Esse acontecimento acabou resultando em atraso de mais de dois meses para o início do experimento.

Em decorrência do grande número de fases, do desenho do estudo ser cruzado e do tempo de cada fase (14 dias) tivemos que lidar com a ansiedade e cansaço dos pacientes. Para isso fazíamos motivação a cada fase para que eles não desistissem do estudo. Adicionalmente, além dos produtos de higiene da pesquisa, era oferecida passagem de ônibus, lanches e brindes no final de cada fase, tudo pensando na motivação dos voluntários. Ainda, foi necessário, fazer ligações para todos os voluntários nos dias das imersões, porque na primeira semana de coleta, três voluntários foram para coleta sem ter feito a imersão prévia, e isso nos preocupou, então para prevenir adotamos essa conduta.

Após sugestão da banca, optamos por não fazer o teste de alteração de cor, com o colorímetro (efeitos adversos), já que o tempo de avaliação era 14 dias para cada produto (dois dias de imersão por 10 minutos cada), então, pouco provável que teria uma alteração notória. Bem como não fizemos a análise microbiológica em tecidos moles, uma vez que seria muito maior o nosso custo e ainda exigiria um espaço físico ainda maior.

Não acrescentamos os dados da entrevista e do questionário após a realização do estudo, devido à limitação de palavras pela revista escolhida. Mas temos em arquivo essas informações, para estudos futuros.

Em virtude do tempo dispendido na adequação da metodologia, o cronograma previsto para início dos experimentos foi alterado. Tendo em vista, que 30 voluntários previamente selecionados, tiveram que ser excluídos do estudo. Adicionalmente, modificamos o protocolo de análise de biofilme de UFC/mg de biofilme para UFC/mm², já que optou-se em não realizar a análise de peso seco, uma vez que foi pré-determinado a área de coleta em 2 cm por 2 cm.

Após as considerações da banca, resolvemos alterar a forma de analisar as imagens digitais. No projeto inicial era pelo método visual, pelos índices propostos por AMBJORSEN et al. (1984), porém, por se tratar de um método mais antigo e subjetivo, foi proposto fazer as análises através de um software e/ou programa de análise de imagens de computador, julgando ser um método moderno, barato e além de também estar sendo muito usado em ensaios clínicos de protocolos de higiene. Optamos então, pelo software muito usado nos artigos clínicos avaliando quantificação de biofilme, Image Tool 3.00. Inicialmente a dificuldade foi conseguir baixar o programa, mesmo sendo de livre acesso, não roda em Windows mais modernos e nem em MAC, versões mais novas não existem. Então tivemos que adaptar um notebook Intel CORE i5-64 bits transformando-o em um processador Microsoft Windows 7-32 bits.

Após isso, as imagens digitais foram processadas, transferidas para o programa Power Point (Microsoft 2010) para serem recortadas e removidas o fundo para então, serem transferidas para o software (Image Tool, Windows, version 3.00; University of Texas Health Science Center). Dentro do programa cada imagem foi

manipulada separadamente, foram transformadas para escalas de cinza, e através de uma ferramenta manual de limiarização chamada Threshold tool, foi separado (por pixels) o biofilme corado do fundo da base da prótese. O programa gerava um histograma binário e calculava quantos porcentos de pixels (biofilme) tinha a imagem selecionada. A análise foi feita de um dos lados da base da prótese total superior que foi corada.

Porém, após as tabulações dos dados do estudo clínico e levantamento bibliográfico atual, julgamos pertinente acrescentarmos uma comparação de dois diferentes métodos de avaliação da formação de biofilme após diferentes protocolos de higiene de prótese (análise microbiológica (método objetivo) com análise de imagem através de software de computador (método subjetivo). Uma vez que segundo a literatura, faltam estudos clínicos e padronizações metodológicas para definir qual seria o melhor protocolo químico de higienização de próteses (DE SOUZA et al., 2015). Bem como, não existe um consenso na literatura atual de qual seria a melhor metodologia empregada para quantificação de biofilme após diferentes protocolos clínicos de higiene (MCCABE et al., 1996; NIKAWA et al., 1999; CRUZ et al., 2011; DE SOUZA et al., 2015). Sentimos necessidade de buscar essas respostas, acrescentando uma comparação metodológica. No entanto, não foi possível rodar o teste estatístico de correlação das duas metodologias ou mesmo um modelo de regressão para fazer a comparação e validação. As análises foram independentes.

4 Artigo 1

Chemical hygiene protocols for complete dentures: A Randomized Clinical Trial[§]

Fernanda Valentini Mioso,¹ Tamires Timm Maske,¹ Maximiliano Sérgio Cenci,¹ Noéli Boscato,¹ Tatiana Pereira-Cenci¹

¹ Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Corresponding author: Prof. Dr.T. Pereira Cenci, Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Rua Gonçalves Chaves, 457, room 508, 96015-560, Pelotas, RS, Brazil. Fax: +55 53 32256741. E-mail: tatiana.cenci@ufpel.tche.br

Abstract word count: 182

Total word count (Abstract to Acknowledgments): 3.127

Total number of tables/figures: 3

Number of references: 40

Key words: Chemical Products, Cleaning Dentures, Randomized Controlled Trial, Denture Cleansers, Denture Hygiene

[§] Artigo formatado segundo as normas do periódico *Journal of Dental Research*

Abstract

To assess the effectiveness of various chemical hygiene clinical protocols on reducing microbial viability of the biofilm formed on complete denture. This crossover randomized clinical trial was a triple blind study (subjects, dentist and outcome analysis) where complete denture wearers without candidiasis were randomly divided into four groups (n=40) according to the chemical cleanser: water (placebo), 0.5% sodium hypochlorite solution, 0.12% chlorhexidine gluconate solution or 5% sodium bicarbonate solution. The biofilm formed on palate and denture's teeth were collected and assessed on each experimental phase for quantitative microbiological analysis at the 7th and 14th days. Two subjects were lost. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's test. The use of sodium hypochlorite and chlorhexidine led to lower total microorganisms and mutans streptococci counts at 14 days ($P=0.04$) with both chemical cleansers showing similar effectiveness ($P=0.819$). There was no statistically significant difference in *C. albicans*, non-*albicans* and lactobacilli counts in all treatments and time points studied ($P>0.05$). The use of sodium hypochlorite and chlorhexidine chemical cleansers resulted in an appropriate strategy for biofilm control in complete denture healthy wearers. NCT01906242

INTRODUCTION

Poor denture hygiene is a common problem found in complete denture wearers (Srinivasan and Gulabini 2010; Iinuma et al. 2014). Biofilm formed on tissues and denture surface is a significant cofactor in the pathogenesis of denture stomatitis, whereas biofilm accumulation when not removed may also be responsible for multiple local and systemic diseases (Uludamar et al. 2010; Duyck et al. 2013; Müller, 2015), such as pneumonia and respiratory infections (Iinuma et al. 2014; Müller 2015). This occurs because dentures can

serve as reservoir for distant infections compromising health and resulting in higher susceptibility to infection (Duyck et al. 2013).

Although brushing alone is recommended (Nikawa et al. 1999) to decrease biofilm formation (Paranhos et al. 2013), effective biofilm removal requires a degree of manual dexterity often lacking among elderly individuals (Srinivasan and Gulabini 2010; Paranhos et al. 2013). Because of this a combination of mechanical and chemical hygiene clinical protocols could be required to reduce denture biofilm accumulation (Andrade et al. 2014; de Souza et al. 2015) in order to effectively maintain a disease-free oral environment (Srinivasan and Gulabini 2010; Iinuma et al. 2014; Müller 2015).

Multiple chemical denture cleansers as alkaline peroxides, alkaline hypochlorite, diluted acids, disinfecting agents, and enzymes have been tested in vitro (Salles et al. 2015; Jeyapalan et al. 2015; Panariello et al. 2015). Effectiveness in biofilm removal without destroying the denture surface is desired. The literature reports that alkaline peroxides (Andrade et al. 2014; de Andrade et al. 2012; Chan et al. 1991), sodium bicarbonate (Silhacek and Taake 2005; de Souza et al. 2009), Chlorhexidine (de Andrade et al. 2012; Ellepola and Samaranayake 2000), and hypochlorite solutions (Salles et al. 2015; de Sousa et al. 2015) are effective to reduce biofilm formation on complete dentures.

Due to the lack of clinical studies on the best chemical protocol for the disinfection and removal of biofilm on complete dentures (de Souza et al. 2015), this clinical trial assessed which chemical cleanser would result in lower biofilm formation on maxillary complete dentures. The hypothesis tested was that the use of sodium hypochlorite solution associated to brushing would result in reducing microbial viability of the the biofilm formatted.

MATERIALS AND METHODS

This randomized clinical trial had a crossover and triple blind design (patient, dentist and biofilm analysis) with 4 phases of 14 days each, where complete denture wearers were randomized into four groups (n=40) depending on the chemical cleanser to be used for denture soaking once a week (water – placebo, sodium hypochlorite, chlorhexidine or sodium bicarbonate) the immersion were made on Saturdays and biofilm was collected after 7 and 14 days of treatment on Tuesdays. The study was registered at ClinicalTrials.gov (NCT01906242), approved by the Research and Ethics Committee (#140/2009) and reported according to the CONSORT statement (Schulz et al. 2011).

One hundred and forty-three (n=143) complete denture wearers that had changed their dentures in the Dental School (Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil) and were wearing the dentures for at least two year were invited and selected according to the inclusion criteria: complete denture wearer with good general and oral health and ability to comply with the experimental protocol. The exclusion criteria eliminated those taking antibiotics or antifungal agents during the 3 months prior to the study, and clinically diagnosed denture stomatitis patients. After explaining the study, 128 accepted to participate; however, 3 were excluded because of antibiotic intake, 10 were diagnosed with denture stomatitis or systemic diseases; 45 had not ability to comply with the experimental protocol, and 30 participants were enrolled in another study and could not participate. Forty volunteers (31 women, 9 men) aged between 58 and 67 years old were selected (Figure 1). The oral health was assessed and subjects signed written informed consent before being enrolled in this study.

The primary study outcome was reducing to viable microorganisms' count after employing different chemical cleansers to be used in denture wearers. This therefore was the variable used for the determination of sample size. The sample size was calculated presuming a superiority trial with statistical tests performed with 80% power and $\alpha = 0.05$. For this, data

from previous publication determined twenty-four volunteers were required for experimental and control group (Sheen and Harrison 2000). Taking possible losses into account due to the crossover nature of the design, our final sample size was $n=40$.

Initially, before starting the study, the original dentures of all volunteers received a standardized mechanic polishing with a lathe, a brush wheel with pumice slurry to obtain the same smooth surface, as previously described (Valentini et al. 2013). Every time a phase ended, this procedure was redone to standardize cleaning of prostheses.

The forty volunteers were randomized and assigned to each group using a computer-generated list of random numbers. As a result, neither the investigators nor the participants knew which treatment was being used (triple-blind study design). The solutions were placed in plain white recipients of the same size and shape, by a researcher not involved in the study and identified by Greek letters according to the treatment previously randomized. An identifying number was assigned to each participant, and each subject received one recipient (enough for 2 weeks of use) for each tested phase. The expected amount used by subjects corresponded to half of the recipients for each week, which was enough to cover the prosthesis. They were asked to return the recipient at every visit. And before the experiment beginning all volunteers did a week of protocol with water (initial wash-out) to become accustomed to the experiment.

Subjects were instructed to wear the dentures at all times (Sheen and Harrison 2000), and did not receive any instructions regarding daily diet. Likewise, written instructions were provided on how to use the product, along with the treatment protocol.

This study was set up using a crossover design. Each volunteer was randomly assigned into 4 groups, according to the chemical treatments: water (placebo control), 0.5% sodium hypochlorite solution (Barnabé et al. 2004; Rossato et al. 2011), 0.12% chlorhexidine

gluconate solution (de Andrade et al. 2012; Rossato et al. 2011), and 5% sodium bicarbonate solution (Rossato et al. 2011) assigned to wear one of the products for 2 weeks.

The same company ISO certified manufactured all solutions (Uso Indicado, Pharmacy of Manipulation, Pelotas, Brazil). All cleansing protocols were the same, soaking the denture for 10 min once a week, and this procedure was carried out by the patients (de Andrade et al. 2012; Barnabé et al. 2004). After completing each phase, the volunteer returned to change the product for another. In between phases, the volunteer used running water (wash-out) for 7 days for each experimental phase to eliminate possible residual effects from the chemical cleanser. The subjects were instructed to brush their dentures 3 times a day for 1 min with a toothbrush and toothpaste (Colgate Tripla Ação, Industrial LTDA, São Paulo, Brazil) provided by the researchers, to wash their mouths with tap water rinse after brushing (de Andrade et al. 2011), and wash the dentures with tap water after the immersion period used. For all patients, water only was used to clean dentures for an initial one-week period before the study began. The total study period was therefore 77 days of the experiment (four phases of 14 days each) with three weeks of seven day to wash-out with water.

The biofilm formed on one side of the palate and posterior teeth of the denture was collected with a sterile microbrush according to a 2 cm x 2 cm template of the area to be swabbed after 7 and 14 days of treatment. The microbrush was added on microcentrifuge tubes containing sterile saline solution (1 ml), and the biofilm was detached from this surface using vortex agitation for 30s followed by sonication process at 20W with three pulses of 10 s each. The biofilm suspensions were serially diluted, inoculated on specific media, and incubated at 37 °C (anaerobiosis : Blood agar, Rogosa agar and Mitis Salivarius agar supplemented with 0.2 U/ml of bacitracin; aerobiosis-CHROMagar *Candida*) for 24-96 h (Valentini et al. 2013). The CFU were counted using a stereomicroscope and the results expressed in CFU/mm².

Statistical analyses were done using SPSS Program v.20 (IBM, Armonk, USA) using a significance level fixed at 5%. The hypothesis assumed differences among treatments and time points. For comparisons among the different treatment group the investigator in charge of the statistical analysis was informed of the tube letters corresponding to each tested product and those corresponding to the active treatment product. For microbiological analysis, data that violated the assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were transformed by ranks and analyzed by two-way ANOVA followed by all pairwise comparisons with Tukey's method.

RESULTS

This randomized clinical trial had 4 phases of 14 days each, where complete denture wearers were randomized into four groups (n=40) depending on the chemical cleanser to be used for denture soaking and biofilm was collected after 7 and 14 days of treatment. Two patients withdrew the experiment; both had to be submitted to medical surgeries and could not return to the appointments. One subject data was only considered in 2 of the 4 treatments because on the third treatment she reported to have smelled a different odor of the solution and the researchers decided to remove her from the experiment, as she could not adhere to the given protocol, compromising the blinding of the trial. Other three did not return to some of the appointments. Three subjects forgot to do the immersion recommended by the researchers in a specific phase, and the data for the phase was considered as "missing data" in the analysis.

There were no statistically significant differences in *C. albicans*, non-*albicans* and lactobacilli counts in all treatments and time points assessed ($p > 0.05$, Table 1). For mutans streptococci, lower counts were found after 14 days ($p = 0.016$) when sodium hypochlorite, chlorhexidine and sodium bicarbonate were used ($p = 0.004$). Considering total microorganisms there were statistically significant differences among treatments, with sodium

hypochlorite and chlorhexidine showing better ($p<0.001$) and similar performances ($p=0.819$) when compared with sodium bicarbonate and water, irrespective of the time point assessed.

DISCUSSION

This clinical trial evaluated chemical cleansers on biofilm formation on healthy complete denture wearers. In general, sodium hypochlorite and chlorhexidine provided lower *mutans streptococci* and total microorganisms counts in both palate and teeth of the dentures. Therefore, the research hypothesis was partially accepted since the use of sodium hypochlorite solution associated to brushing resulted in lower microbial viability of some bacteria such as *Streptococcus mutans* and *total microorganism*.

In this study, the subjects used all treatments once a week for 2 weeks (Duyck et al. 2013). After 7 days (i.e. soaking the denture once in the treatment), no differences were found among the tested cleaning protocols. However, after 14 days sodium hypochlorite and chlorhexidine decreased microorganisms counts. These time points were chosen because they represent the initial development and the maturing (14 days) of biofilms on complete dentures. Our results showed no differences regarding *C. albicans*, *non-albicans* and lactobacilli counts for all cleaning protocols assessed, although different *in vitro* studies have shown that sodium bicarbonate (de Andrade et al. 2012; Silhacek et al. 2005), chlorhexidine (de Andrade et al. 2012; Ellepola and Samaranayake 2000) and hypochlorite solutions (Salles et al. 2015; de Souza et al. 2013) are effective in reducing several microorganisms. In fact, it seems that the same species show increased resistance to commonly used antifungal therapies (Valentini et al. 2013; Muklerjee and Chandra, 2004). One possible hypothesis for the lacking of effect of denture cleanser tested on *Candida albicans* can be the lower concentrations of the chemical treatments (0.5% sodium hypochlorite solution, 0.12% chlorhexidine gluconate solution and 5% sodium bicarbonate solution), the short immersion period used (10 minutes once to week) or even a short follow-up (14 days). Studies have shown that at high

concentrations the chemical hygiene clinical protocols showed more effectiveness at killing microorganisms (Montagner et al. 2009; Ellepola and Samaranayake 2000; Schulz et al. 2010), but with the disadvantage of roughening denture surfaces, which may result in more biofilm accumulation.

The literature reports mainly aspects related to *Candida* infections (O'Donnelli et al. 2015); however, scientific evidence suggests that denture stomatitis is a polymicrobial disease in which bacterial and fungal interactions collaborate to form a symbiotic biofilm (Duyck et al. 2013; O' Donnelli et al. 2015; Susewind et al. 2015). For example, *Lactobacillus* species present antagonistic relationship with *Candida* and investigations suggested that this bacteria can modulate the host response, up-regulating cytokines when co-cultured with *C. albicans*, which could be associated with the clearance of fungal infection (O'Donnelli et al. 2015; Orsi et al. 2014).

Lower mutans streptococci counts were found when used sodium hypochlorite and chlorhexidine at 14 days. These results are important since although the ability of *Candida albicans* to form biofilms on denture surfaces is a significant cofactor in the pathogenesis of denture stomatitis, other bacterial species are also important denture biofilm components (Susewind et al. 2015). This occurs because during the stage of denture plaque formation the rate of adherence increases with anaerobic bacteria such as mutans streptococci, which appear in the initial phases of biofilm development and seems to have synergism with *Candida species* (Susewind et al. 2015; Pereira-Cenci et al. 2009; Jarosz et al. 2009; Muhamound *et al.* 2012). Also, it has been hypothesized that mutans streptococci may be located in more superficial layers of the biofilm and consequently are more exposed to antimicrobial agents. Yet, these bacteria also increase acidity, which generates environmental conditions for yeast growth (Barnabé et al. 2004). Thus, in a multispecies biofilm, *Candida* spp. would be

protected from denture cleanser action by layers of extracellular matrix and bacterial cells (de Andrade et al. 2011).

In this study, healthy individuals using new complete denture (without clinically diagnosed denture stomatitis) were selected, and this may explain the present results. Although this study has shown no differences in *C. albicans* counts, *C. albicans* is recognized as a contributing factor in the cause of denture stomatitis since these fungi are capable of proliferating in healthy hosts by surviving immune factors, demonstrating increased resistance to commonly used antifungal drug therapies (Nett et al. 2007). In addition, as total microorganisms were reduced, it is expected that these protocols will indeed help to maintain oral health.

This clinical study showed that, from a microbiological point of view, it makes no difference to use sodium hypochlorite or chlorhexidine gluconate solution. This is further reinforced by the findings that both sodium hypochlorite (Salles et al. 2015; Jeyapalan et al. 2015; de Souza et al. 2013) and chlorhexidine gluconate solution (de Andrade et al. 2012) exhibit significant effects on reducing biofilm formation. Therefore, other properties should then be considered when choosing one or another. Chlorhexidine gluconate solution presents substantivity, which resulting in residual antimicrobial effects for days to weeks when used (Carrilho et al. 2010; Lima et al. 2006). In contrast, it also presents some undesired effects, including mild discomfort or burning sensation, epithelium exfoliation, teeth staining, enhancement of supragingival calculus and color alteration of artificial teeth and denture basis (Ellepola and Samaranayake 2000). Sodium hypochlorite has a soft-tissue dissolving ability, but bad taste, nasty smell, corrosive effect on metals and increased roughness in the denture surfaces (de Souza et al. 2015). Thus, the chemical disinfectant should be chosen because of its efficiency in eliminating microorganisms without adversely affecting the denture materials. The current gold standard solution (sodium hypochlorite) acts directly on the organic matrix

(Salles et al. 2015) present fungicidal and bactericidal properties and can remove stains (Lima et al. 2006; Andrade et al. 2014) of the plaque resulting in the dissolution of the polymer structure probably due to its alkaline pH. Such alterations could be attributed to the loss of cell membrane integrity and release of cytoplasmic content caused by this alkaline solution (Estrela et al. 2002; Fukuzaki 2006). Chlorhexidine acts against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast, filamentous fungi and facultative anaerobic and aerobic organisms (Fardal and Turnbull 1986). According to the concentration used, chlorhexidine can affect the target cell distinctly. Under low concentrations, it is accumulated on the cell surfaces of bacteria and yeast, inducing cell membrane disorganization and leakage of cytoplasmic components whereas higher drug concentrations produce a coagulation of cytoplasmic constituents in those microorganisms (Bobichon and Bouchet 1987).

Removal of the denture during the night and its correct hygiene with the daily using using denture cleaning solutions are mentioned in the literature as effective in the prevention and treatment of denture stomatitis (Duyck et al. 2013; O'Dannelli et al. 2015). In our study, the subjects were instructed not to remove the prosthesis at night because all subjects reported not to remove their dentures in their established habits. This is a personal and cultural issue in our country, and other study has reported a significant number of edentulous patients wearing dentures during the night (Takamiya et al. 2011). Still, our results should be interpreted with caution. This study was carried out in healthy individuals, the hygiene clinical protocols were standardized and all individuals received oral hygiene instruction and motivation in every appointment.

The results obtained from *in vitro* studies are the most reported in literature, which may not represent the aspects involved *in vivo* (Valentini et al. 2013) because antimicrobial properties of saliva also may contribute to the tissue/patient factors that influence biofilm formation, not only the substrate (O' Dannelli et al. 2015). Also, few randomized clinical

trials have shown the several factors linked to biofilm formation, microbial specificity and effectiveness of chemical treatment (de Souza *et al.*, 2015).

CONCLUSION

Sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate solution are effective to reduce microbial viability of the biofilm formed on complete denture.

Acknowledgments

The authors thank the laboratory technician Carmem Lúcia Machado Lopes (Laboratory of Oral Microbiology-School of Dentistry, UFPel, Pelotas, RS, Brazil). The second author received scholarships during this study from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq- Brazil) [Process No. 130090/2013-1]. Grants from that Council also supported this study (Process No. 482746/2013-0).

References

- Andrade IM, Andrade KM, Pisani MX, Silva-Lovato CH, Souza RF, Paranhos HFO. 2014. Trial of an experimental castor oil solution for cleaning dentures. *Braz Dent J.* 25(1):43-7.
- Barnabé W, Mendonça TN, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. 2004. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 31(5):453-459.
- Bobichon H, Bouchet P. 1987. Action of chlorhexidine on budding *Candida albicans*: scanning and transmission electron microscopic study. *Mycopathol.* 100(1):27-35.
- Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, et al. 2010. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater.* 26: 779-85.
- Chan EC, Iugivaz I, Siboo R, Bilyk R, Barolet R, Amsel R. 1999. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. *J Can Dent Assoc.* 57(12): 937-939.
- de Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Souza-Gugelmin MC, Paranhos HFO. 2012. Effect of chlorhexidine on denture biofilm accumulation. *J Prosthodont.* 21(1):2-6.
- de Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Souza-Gugelmin MC, Paranhos HFO. 2011. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and *mutans streptococci* in denture biofilm. *Gerodontology.* 28(4):264-270.

- de Sousa Porta SR, de Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Del Bel Cury AA. 2014. Evaluation of sodium hypochlorite as a denture cleanser: a clinical study. *Gerodontology*. 32(4):260-266.
- de Souza FAC, Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AO. 2009. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. *Braz Oral Res*. 23(4): 381-385.
- de Souza RF, de Freitas POH, Lovato CHS, Abu-Naba'a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. 2015. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Systematic Review*.
- Duyck J, Vandamme K, Muller P, Teughels W. 2013. Overnight storage of removable dentures in alkaline peroxide-based tablets affects biofilm mass and composition. *J Dent*. 41(12):1281-1288.
- Ellepola ANB, Samaranayake LP. 2000. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 11(2):172-198.
- Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J*. 13(2):113-117.
- Fardal O, Turnbull RS. 1986. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 112(6):863-869
- Fukuzaki S. 2006. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci Technol*. 11(4):147-57.
- Iinuma T, Arai Y, Abe Y, Takayama M, Fukumoto M, Fukui Y. 2014. Denture wearing during sleep doubles the risk of pneumonia in the very elderly. *J Dent Res*. 94(3 Suppl):28S-36S.

Jarosz LM, Deng DM, Van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. 2009. Streptococcus mutans competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. Eukaryotic Cell. 8(11):1658-1664.

Jeyapalan K, Kumar K, Azhagarasan NS. 2015. Comparative evaluation of the effect of denture cleansers on the surface topography of denture base materials: An in-vitro study. J Pharm Bioallied Sci. 7(Suppl 2):548S-453S.

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

Lima EM, Moura JS, Del Bel Cury AA, Garcia RC, Cury JA. 2006. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. J Oral Rehabil. 33(5):356-62.

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

Muhamound H, Williams DW, Hannigan A, Lynch CD. 2012. Influence of extra-cellular matrix proteins in enhancing bacterial adhesion to titanium surfaces. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 100(3):1319-1327.

Mukherjee P, Chandra J. 2004. Candida biofilm resistance. Drug Resist updat. 7(4-5): 301-309.

Müller F. 2015. Oral hygiene reduces the mortality from aspiration pneumonia in frail elders. J Dent Res. 94(3 Suppl):14S-16S.

- Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D. 2007. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(2):510-20.
- O'Donnelli LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, Bradshaw D, Lambert M, Malcolm J, et al. 2015. The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. *PLoS One.* 10(9):e0137717.
- Orsi CF, Sabia C, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia RG, Peppoloni S, et al. 2014. Inhibitory effects of different lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. *J Biol Regul Homeost Agents.* 28(4):743-52.
- Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Paravina AC, Jorge JH, Giapoalo ET. 2015. Effects of short-term immersion and brushing with different denture cleansers on the roughness, hardness, and color of two types of acrylic resin. *Am J Dent.* 28(3):150-56.
- Paranhos HFO, Salles AES, Macedo LD, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Watanabe E. 2013. Complete denture biofilm after brushing with specific denture paste, neutral soap and artificial saliva. *Braz Dent J.* 24(1): 47-52.
- Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigo-Garcia RC. 2009. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont.* 20(3):308-10.
- Rossato MB, Unfer B, May LG, Braun KO. 2011. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. *Oral Health Prev Dent.* 9(3): 221-227.

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

Schulz KF, Altman DG, Moher D. 2011. CONSORT statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. Int J Surg.9(8):672-677.

Sheen SR, Harrison A. 2000. Assessment of plaque prevention on dentures using an experimental cleanser. J Prost Dent. 84(6):594-601.

Silhacek KJ, Taake KR. 2005. Sodium bicarbonate and hydrogen peroxide: the effect on the growth of Streptococcus mutans. J Dent Hyg. 79(4):7.

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

Susewind S, Lang R, Hahnel S. 2015. Biofilm formation and Candida albicans morphology on the surface of denture base materials. Mycoses. 58(12):719-727.

Takamiya AS, Monteiro DR, Barão VA, Pero AC, Compagnoni MA, Barbosa DB. 2011. Complete denture hygiene and nocturnal wearing habits among patients attending the Prosthodontic Department in a Dental University in Brazil. Gerodontology. 28(2):91-6.

Uludamar A, Ozkan YK, Kadir T, Ceyhan I. 2010. In vivo efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on Candida albicans in patients with denture stomatitis. J Appl Oral Sci. 28(3):291-296.

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

Table 1. Microbiological results for microorganisms in the biofilm according to the experimental conditions (CFU/mm², mean ±SD)

Treatment	Area Collected	<i>Candida albicans</i> (x10 ³)		<i>Candida non-Albicans</i> (x10 ³)		<i>Mutans Streptococci</i> (x10 ⁵)		<i>Lactobacilli</i> (x10 ⁶)		<i>Total microorganisms</i> (x10 ⁸)	
		7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14days	7 days	14 days
CHX (n=38 /36)	Palate	0.4 ±2.2a	1.2 ±4.3a	0.1 ±0.3a	1.3±5.3a	0.0001 ±0.3a	0.1 ±0.8b	0.1 ±0.2 a	4.0 ±18.0a	0.1 ±0.2b	0.3 ±0.2b
	Teeth	0.7 ±2.7a	0.4 ±1.4a	0.02 ±0.1a	0.2 ± 1.0a	0.4 ±1.6a	0.1 ±0.4b	0.8 ±2.3a	0.4 ±0.8a	0.2 ±0.6b	1.0 ±0.4b
NaClO (n=36/38)	Palate	0.01 ±0.1a	0.2 ±1.0a	0.001 ±0.01a	0.01 ±0.03a	0.3 ±1.5a	3.8 ±23.3b	0.1 ±0.4 a	0.2 ±0.4a	0.3 ±0.9b	0.1 ±0.3b
	Teeth	0.4 ±2.2a	0.02 ±0.1a	0 ±0a	0.001 ±0.01a	0.1 ±0.4a	0.2 ±0.5b	0.1 ±0.4 a	0.2 ±0.8a	0.3 ±0.6b	0.1 ±0.3b
NaHCO ₃ (n= 36/36)	Palate	1.7 ±6.3a	1.4 ±7.4a	7.4 ±44.0a	22.0 ±131.2a	1.6 ±6.4a	1.5 ±6.9b	0.5 ±1.2 a	0.4 ±0.8a	0.3 ±0.6a	0.6 ±0.9a
	Teeth	1.9 ±7.0a	1.0 ±5.0a	0.6 ±2.4a	0.2 ±0.9a	8.0 ±3.2a	0.7 ±3.9b	0.2 ±0.5 a	0.6 ±2.6a	0.9 ±1.7a	0.4 ±0.7a
H ₂ O (n=37/ 38)	Palate	2.0 ±6.5a	1.0 ±3.3a	1.1 ±6.2a	0.01 ±0.1a	1.3 ±5.7a	4.3 ±18.8a	1.7 ±5.4 a	0.7 ±1.8a	0.6 ±1.0a	0.8 ± 2.0a
	Teeth	0.3 ±1.0a	0.2 ±0.8a	1.0 ±0.4a	0.1 ±0.03a	0.2 ±0.6a	1.0 ±5.4a	0.2 ±0.6 a	1.0 ±0.3a	0.7 ±1.2a	0.5 ±0.7a

Lower case letters represent statistically significant differences among treatments for mutans Streptococci (p=0.04) and total micro-organisms (p=0.819). In day 14, mutans streptococci counts were lower sodium hypochlorite (p=0.016), which showed similar result to chlorhexidine (p=0.004). These three treatments were similar and different from water (p>0.05). When considering total microorganisms there were differences among treatments (p<0.001), sodium hypochlorite and chlorhexidine were similar (p=0.819), both resulting in reduced microbial counts, (p=0.001) when compared with sodium bicarbonate and water, irrespective of the time point assessed.

CONSORT 2010 Flow Diagram

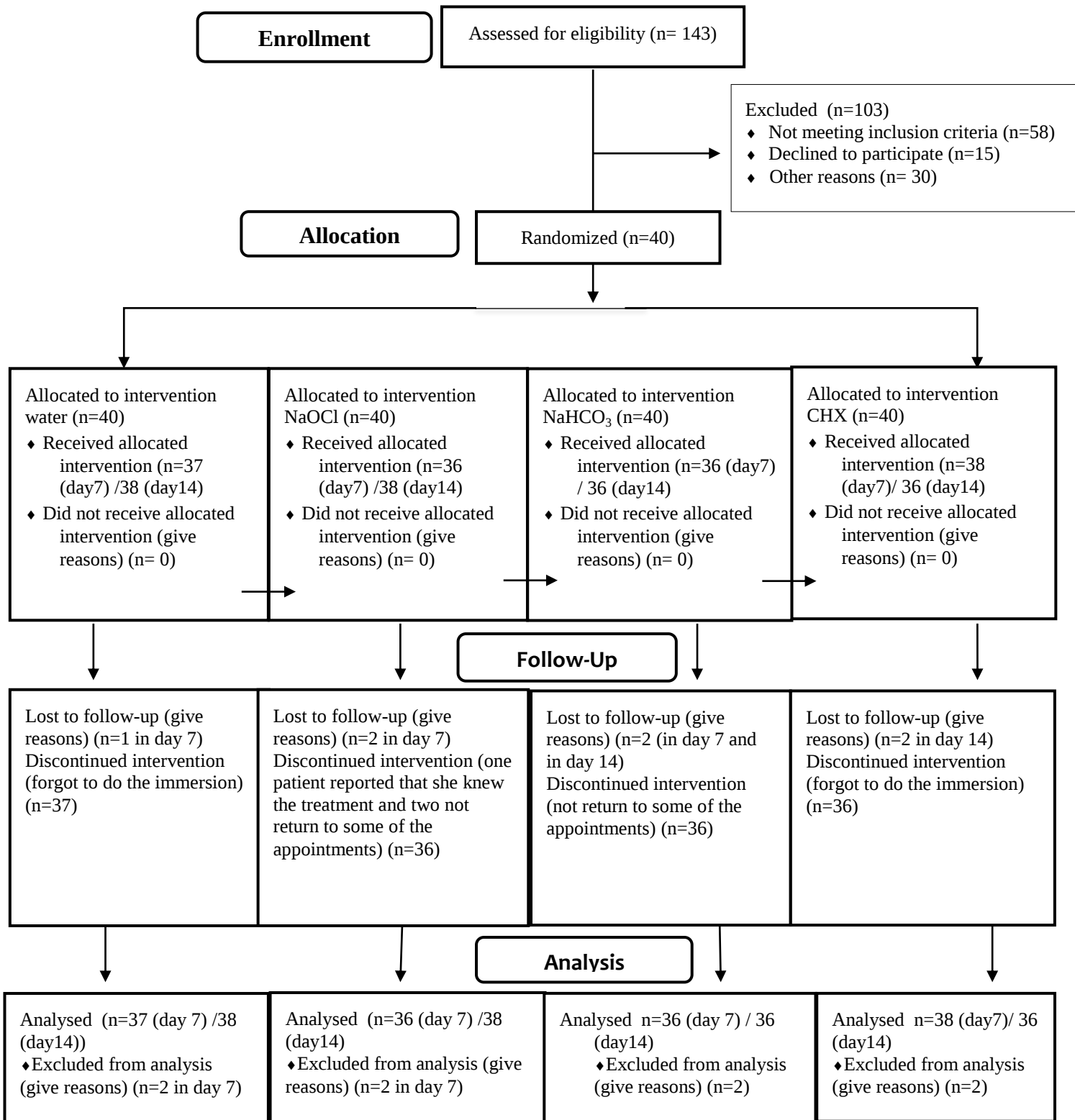


Figure 1: Flowchart of the trial phases



CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page No
Title and abstract			
	1a	Identification as a randomised trial in the title	58
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	59
Introduction			
Background and objectives	2a	Scientific background and explanation of rationale	59-60
	2b	Specific objectives or hypotheses	60
Methods			
Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	61
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	61
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	61
	4b	Settings and locations where the data were collected	62
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	62 and 63
Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	63
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	NA
Sample size	7a	How sample size was determined	62 and 63
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	NA
Randomisation:			
Sequence generation	8a	Method used to generate the random allocation sequence	61
	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	62 and 62
Allocation concealment	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	62 and 62

mechanism			
Implementation	10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	62
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and how	62 and 63
	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	64 and 63
Statistical methods	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	63 and 64
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	NA
Results			
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	64
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	64
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	64 and 70
	14b	Why the trial ended or was stopped	NA
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	70
Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	70
Outcomes and estimation	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	64
	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	NA
Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	64
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	64
Discussion			
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	68
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	65, 66 and 67
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	65, 66 and 67
Other information			

Registration	23	Registration number and name of trial registry	59
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	www.clinicaltrials.gov
Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	23

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.

4 Artigo 2

Comparative study of microbiological and computerized analyses to evaluate the efficacy of chemical protocols for cleaning dentures [§]

Fernanda Valentini Mioso,¹ Fernanda Machado,¹ Tamires Timm Maske,¹ Maximiliano Sérgio Cenci,¹ Noéli Boscato,¹ Tatiana Pereira-Cenci,¹

¹ Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Dr. T. Pereira Cenci

Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas,

Rua Gonçalves Chaves 457, room 508,

96015-560, Pelotas, RS, Brazil

Tel/Fax: +55 53 32256741 x.135

E-mail: tatiana.cenci@ufpel.tche.br

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CNPq (482746/2013-0 and 130090/2013-1) and Carmem Lúcia Machado Lopes for technical assistance the microbiology laboratory of Federal University of Pelotas.

[§] Artigo formatado segundo as normas do periódico *The Journal of Prosthetic Dentistry*

ABSTRACT

Statement of problem. Although a large number of methodologies for assessing chemical denture hygiene efficacy exist, there is still no consensus of which methodology is the more sensitive.

Purpose. The purpose of this study was to compare data from a randomized controlled trial that assessed different chemical denture hygiene protocols using microbiological and computerized methodologies.

Material and methods. Data of a randomized clinical trial (n=40) comparing four chemical cleanser solutions (water – placebo, 0.5% sodium hypochlorite, 0.12% chlorhexidine gluconate or 5% sodium bicarbonate) were used. Two methodologies were considered for this analysis: microbiological analysis and a computerized image analysis. All subjects had their dentures divided into two halves to assess the two methodologies. On one side, biofilm formed on internal surface of the maxillary dentures was collected and processed to obtain total microorganisms count. On the other side the biofilm was stained, and the photographs analyzed using a computerized program (Image Tool 3.0) for pixel averaging quantification. Data were analyzed with two-way ANOVA followed by Tukey *pos hoc* test with a significance level set at 5% for all analyses.

Results. Microbiological analysis showed that sodium hypochlorite and chlorhexidine yielded in lower microbial counts ($P<.001$), whereas the image analysis showed no statistically significant difference among treatments ($P>.05$).

Conclusions. The two methodologies resulted in different outcomes, with microbial analysis count showing a more sensitive effect of the treatments tested.

CLINICAL IMPLICATIONS

Assessment of denture biofilm through microbial analysis can provide more sensitive information on the efficacy of cleaning protocols than the use of an image analysis system.

INTRODUCTION

Poor denture hygiene allows the accumulation of biofilm on tissue and denture surfaces favoring the proliferation of microorganisms and resulting in inflammation and infection.¹ As a consequence, multiple local and systemic diseases such as denture stomatitis,^{2,3} pneumonia and respiratory infections,^{4,5,6,7} may arise. Thus, the correct use of denture hygiene protocols and instructing the patient about the importance of maintenance of denture hygiene is mandatory.⁸

Various clinical methods for assessing denture-cleansing efficacy have been reported.^{9,10,11} The most frequently methods used are microbiological evaluation (colony-forming units counts – CFU),^{10,12,13} scanning microscopic images,^{14,15,16} staining,⁹ associated with visual scoring of plaque,^{17,18,19,20} UV analysis,²¹ planimetric plaque systems,⁸ or computerized methods (image analysis system).^{1,13,22,23} The main difficulty is to choose a suitable method for biofilm quantification on denture surfaces,^{1,9,10,11} and the lack of standardization and validation of those methods.^{1,11,18}

Collecting microbial samples with viable counts or other simplified cultures have been reported as leading to a more accurate result.⁹ Accordingly, its qualification can be regarded as a good and reliable measurement for denture hygiene outcomes,¹ since microbiological method can facilitate the detection and quantification of different **viable** species (yeast and bacteria) from different samples on a single isolation plate.²⁴ Nevertheless, this method is very expensive, laborious and methodologically complex, while sometimes impossible to be handled in the clinical routine.

Other biofilm quantification methods tend to rely on subjective or image analysis derived estimates of area coverage of dentures by stained biofilm.^{9,18,19} Staining associated to the analysis of the image by using a pixel averaging is easy and cheap and does not depend on the examiner skills or other forms of calibration,²⁵ therefore less likely to produce operator errors and thus providing greater accuracy,²⁶ and accurate results.²² Programs, accurately calculate areas of complex scattered and broken up plaque regions from calibrated digital images.^{1,11,19,26} Yet, methods where the percentage of the biofilm area is measured are more laborious than the use of clinical indexes,²⁵ and require a longer amount of time spent on making the measurements.¹

Clinical studies that have considered the standardization of these methodologies to assess denture hygiene protocols are still scarce. There are few studies comparing photograph analysis to microbiological count method. Thus, the purpose of this study was to compare data from a randomized controlled trial that assessed different chemical denture hygiene protocols using microbiological and computerized methodologies. The hypothesis tested was that the image analysis presents similar results to that of the microbiological method regarding biofilm analysis after chemical hygiene.

MATERIALS AND METHODS

This study has compared the outcomes of a randomized clinical trial where chemical cleansing protocols (water – placebo; sodium hypochlorite, chlorhexidine, or sodium bicarbonate) were used for 14 days each in a crossover design. Each subject had the biofilm collected and processed leading to results of CFU counts. Also, the biofilm formed was assessed using the photographs obtained from the stained dentures. The main target was to compare if both methods would result in the same outcomes regarding which of the cleansers would be better for cleaning complete dentures.

The clinical trial was approved by the Research and Ethics Committee (#140;/ NCT01906242) and conducted as described elsewhere.²⁷ Briefly, subjects wearing complete maxillary dentures (n=40, aged 58 to 67 years, with 31 women and 9 men) were selected according to the inclusion criteria: good general and oral health and ability to comply with the experimental protocol. The exclusion criteria eliminated those taking antibiotics or antifungal agents during the 3 months prior to the study, and clinically diagnosed denture stomatitis patients.

This randomized clinical trial had a crossover and triple blind design (patient, dentist and biofilm/image analysis) with 4 phases of 14 days each, where complete denture wearers were randomized into four groups depending on the chemical cleanser to be used for denture soaking water (placebo control), 0.5% sodium hypochlorite solution,^{28,29,39} 0.12% chlorhexidine gluconate solution,^{32,34} and 5% sodium bicarbonate solution.²⁹ .

The forty volunteers were randomized and assigned to each group using a computer-generated list of random numbers. As a result, neither the investigators nor the participants knew which treatment was being used (triple-blind study design). All product were made by the same ISO certified manipulation pharmacy (Uso Indicado; Pelotas, Brazil). The solutions were placed in plain white recipients of the same size and shape, by a researcher not involved in the study and identified by Greek letters according to the treatment. An identifying number was assigned to each participant, and each subject received one recipient (enough for 2 weeks of use) for each tested phase. The expected amount used by subjects corresponded to half of the recipients for each week, which was enough to cover the prosthesis. They were asked to return the recipient at every visit. The prosthesis of patients received a standardized mechanic polishing with a lathe, a brush wheel with pumice slurry, before the trial beginning. Every time a phase ended, this procedure was redone to standardize cleaning of prostheses.

All cleansing protocols were soaking the denture for 10 min once a week, and this procedure was carried out by the patients.²⁸ The subjects were instructed to brush their dentures 3 times a day with a toothbrush and toothpaste (Colgate Tripla Ação, Industrial LTDA, São Paulo, Brazil) provided by the researchers, to wash their mouths with tap water rinse after brushing,³² and wash the dentures with tap water after the immersion period used. After completing each phase, the volunteer returned to change the product for another. In between phases, the volunteer used running water (wash-out) for 7 days for each experimental phase to eliminate possible residual effects from the chemical clearer. For all patients, water only was used to clean dentures for an initial one-week period before the study began. The total study period was therefore 77 days: four 7-day periods of cleanser use (14 days) and three 7-day periods of wash-out with water.

The biofilm formed on internal surface of the maxillary complete denture was processed for analysis after 7 and 14 days of treatment. The biofilm formed on one side of the prosthesis was collected after 7 days with a microbrush according to a 2 cm x 2 cm template of the area to be swabbed. The microbrush was added on microcentrifuge tubes containing sterile saline solution (1 ml), and the biofilm was detached from this surface using vortex agitation for 30s followed by sonication process at 20W with three pulses of 10 s each. The biofilm suspensions were serially diluted and inoculated on blood agar, and incubated at 37 °C in anaerobiosis for 96 h.³³ The CFU were count using a stereomicroscope and the results expressed in CFU/mm².

To quantify the biofilm on the other halve, a computerized method associated with a biofilm disclosing agent based.^{1,13,19,34} The internal surfaces of the prosthesis were disclosed by 1% neutral red solution (Replak; Dentsply Ind. e and Ltda) for 1 min,^{1,35,36} and washed with tap water. After staining, all the prostheses were photographed with a digital camera (Canon EOS Digital Rebel Canon Inc., Tokyo, Japan), adjusted at 90° to the internal denture

surface with standardized film-object distance and exposure time. The digital images were processed and transferred to a computer. All images were cut and the background removed in PowerPoint program (Microsoft 2010). For biofilm quantification, the total surface and areas corresponding to the stained regions were converted to color-to-grayscale (Figure 1) and measured using an image processing software (Image Tool; Windows, version 3.00, University of Texas Health Science Center) with the Threshold tool (Figure 2). The same blind researcher did all analyses. Each image was digitally analyzed by distinguishing stained black and white pixels count (biofilm) from unstained internal surface of the denture base. The results were expressed in percentage of stained area in relation to the total area of the internal surface of the denture base (Figure 3).

Statistical analyses were done using SPSS Program v.20 (IBM; Armonk, USA) using a significance level fixed at 5%. The hypothesis assumed that the image analysis system would give similar results to the microbiological method. The results obtained from each methodology were compared regarding the amount of biofilm reduction for each cleanser used and if the result changed from the 7th to the 14th day. Thus, the data were transformed by ranks and analyzed through two-way ANOVA followed by Tukey *pos hoc* test.

RESULTS

Two patients withdrew the experiment (both had to be submitted to medical surgeries and could not return to the appointments) (n=38). One subject data was only considered in 2 of the 4 treatments because on the third treatment she reported to have smelled a different odor of the solution and the researchers decided to remove her from the experiment, as she could not adhere to the given protocol. Three subjects forget to do the immersion recommended by the researchers, in a specific phase, and the data for the phase was

considered as “missing data” in the analysis. Other three subjects did not return to the appointments. .

The analysis of the digital images showed no difference among cleansing protocols ($P > .05$) but showed statistically significant differences between baseline photographs and 7/14 days, with more biofilm on the days 7 and 14 ($P = .02$), Table 1.

For microbiological evaluation total microorganisms, Table 2, counts showed statistically significant differences among treatments ($P < .001$), with sodium hypochlorite and chlorhexidine similar ($P = .819$), and both resulting in reduced microbial counts ($P = .001$) when compared with sodium bicarbonate and water, irrespective of the time point assessed.

DISCUSSION

This study compared two methodologies used for to evaluate antimicrobial effect on denture biofilm formed using the data of a clinical trial. Microbial analysis count showed that the use of sodium hypochlorite and chlorhexidine chemical cleansers were appropriate hygiene protocols strategies for denture biofilm control, whereas the image analysis system showed no difference among cleansing protocols. Therefore, the research hypothesis was rejected since differences were found between the different methods of estimating biofilm formation with the cleaning protocols tested.

Several studies have discussed along the years on the precarious conditions of oral health of denture wearers,^{37,38,39,40} and the relationship among denture biofilm, mucosal inflammation and atrophic chronic candidiasis, also known as denture stomatitis.^{3,23} Nevertheless, the knowledge on materials and methods for quantification of denture biofilm formed after using different denture cleansing protocols is an important factor to be considered. It is normally difficult to make comparisons among studies because of the use of

different methodologies to evaluate denture hygiene methods,^{1,9,10,11} but if there is a similarity of at least two methods, comparisons may be simplified.

This study compared a subjective with an objective analysis using the data of a crossover randomized clinical trial. Microbiological analysis (objective analysis) was chosen because it is an accurate methodology⁹ and can facilitate the detection and quantification of different species,²⁴ on effectiveness of denture cleansing methods allowing more accurate and reproducible results. The subjective analysis was chosen because is a relatively modern, easy and cheap method,^{22,25} that can be easily reproduced by practioners⁴¹ and has been used in clinical studies of denture hygiene,^{1,13,1920,22} showing greater discriminating power compared with other also subjective methods.²⁶

In this study, the microbial analysis showed the effectiveness of the sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate solution in reducing total microorganisms count, irrespective of the time point assessed. These results are significant since the many different bacterial species are important denture biofilm components,⁴² as denture stomatitis is a polymicrobial disease in which bacterial and fungal interactions collaborate to form a symbiotic biofilm.^{7,42,43,44,45} Assessment of denture biofilm through microbial analysis count showed a sensitive effect of the treatments tested. Microbial analysis can provide reliable information on the effectiveness of cleaning protocols and can be used with confidence, not only to compare the efficacy of denture cleansing methods and control strategies within a clinical experiment, but also between replicate experiments due to the reliability of its results.⁹ The image analysis system showed no difference among cleansing protocols. These differences in results found between methods probably arose because to extract statistically meaningful morphological parameters from a series of images, the threshold has to be reproducible.⁴⁶ However, thresholding is a subjective operation, where the operator attempts to find the value on the grayscale that best represents the distinction between biomass and

void space as segmenting an image into foreground and background pixels,^{47,48} based on the choice of a specific grayscale value.⁴⁶ The foreground is biofilm and the background is denture base. The operator uses his best judgment and sets the grayscale level in such a way that the binary image appears to capture the essence of the biofilm structure. Variability between operators in choosing the threshold can adversely affect the measurements obtained from the binary image.⁴⁶ Other possible hypothesis is that the biofilm disclosing agent may be too transparent to be detected, which introduces bias into the measurements.⁴⁹ Also, the software has difficulty detecting disclosed plaque on the denture fitting surface due to the paler color of the acrylic on this surface and the irregular surface features creating shadows on the image and because of overlap of some areas, due the anatomy of the prosthesis, strongly interfering on the analysis.

In this study, biofilm quantification was performed on the internal denture surface, since it is the area most often used to evaluate cleansers efficacy.²³ For denture biofilm evidencing the use of neutral red solution,^{35,36} is justified by its high affinity to oral biofilms and the ease of removal.⁵⁰

Thus, a subjective methodology can provide lower accuracy and consequently variations in results and not being the best choice for denture biofilm quantification. Ideally, as the microbiological objective methodology proved more sensitive, reliable and reproducible, it should be employed in future trials.

CONCLUSION

The two methods tested yielded different results, with microbial analysis count showing more sensitivity to test strategies for biofilm control in complete denture wearers.

REFERENCES

1. Cruz PC, Andrade IM, Peracini A, Souza-Gugemin MCM, Silva-Lovato CH, Souza RF, Paranhos Hde F. The effectiveness of chemical denture cleansers and ultrasonic device in biofilm removal from complete dentures. *J Appl Oral Sci* 2011;19:668-73.
2. Budtz-Jørgensen EE. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent* 1979;42:619-23.
3. Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract* 2000;15:28-41.
4. Awano S, Ansai T, Takata Y, Soh I, Akifusa S, Hamasaki T, et al. Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. *J Dent Res* 2008;87:334-9.
5. Gornitsky M, Paradisi I, Landaverde G, Malo AM, Velly AM. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. *J Can Dent Assoc* 2002;68:39-45.
6. Uludamar A, Ozkan YK, Kadir T, Ceyhan I. In vivo efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on *Candida albicans* in patients with denture stomatitis. *J Appl Oral Sci* 2010;18:291-6.
7. Duyck J, Vandamme K, Muller P, Teughels W. Overnight storage of removable dentures in alkaline peroxide-based tablets affects biofilm mass and composition. *J Dent* 2013;41:1281-8.
8. Coulthwaite L, Verran J. Evaluation of in vivo denture plaque assessment methods. *Braz Dent J* 2009;26:207-16.
9. 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;12:153-9.

10. Uludamar A, Ozkan YK, Kadir T, Ceyhan I. In vivo efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on *Candida albicans* in patients with denture stomatitis. *J Appl Oral Sci* 2010;28:291-6.
11. de Souza RF, Paranhos Hde F, Lovato da Silva CH, Abu-Naba'a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015.
12. Chan EC, Iugovaz I, Siboo R, Bilyk R, Barolet R, Amsel R, Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. *J Can Dent Assoc* 1991;12:937-9.
13. Paranhos Hde F, Salles AES, 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.
14. Raab FJ, Taylor CA, Bucher JA, Mann BL. Scanning electron microscopic examination of ultrasonic and effervescent methods of surface contaminant removal from complete dentures. *J Prosthet Dent* 1991;65:255-8.
15. Kulak Y, Atikan A, Albak S, Okar I, Kazazoğlu E. Scanning electron microscopic examination of different cleaners: surface contaminant removal from dentures. *J Oral Rehabil* 1997;24:209-15.
16. Joeng CM, Chung MK. A comparative scanning electron microscopy study of the efficacy of several cleansing methods for cleaning dentures. *Taehan Chikkwa Uisa Hyophoe Chi* 1986;24:1033-48.
17. Tarbet WJ, Axelrod S, Minkoff S, Fratarcangelo PA. Denture cleansing: a comparison of two methods. *J Prosthet Dent* 1984;51:322-5.
18. McCabe J, Murray D I, Kelly P J. The efficacy of denture cleansers. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1995;3:203-7.

19. Sheen SR, Harrison A. Assessment of plaque prevention on dentures using an experimental cleanser. *J Prosthet Dent* 2000;84:594-60.
20. de Freitas KM, Paranhos Hde F. Weight loss of five commercially available denture teeth after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci* 2006;14:242-6.
21. Sarah R, Sheen BDS, Harrison A. Assessment of plaque prevention on dentures using an experimental cleanser. *J Prosthet Dent* 2000;84:594-601.
22. Paranhos Hde F, da Silva CH. Comparative study of methods for the quantification of biofilm on complete dentures. *Pesqui Odontol Bras* 2004;18:215-23.
23. da Silva CH, Paranhos Hde F. Efficacy of biofilm disclosing agent and of three brushes in the control of complete denture cleansing. *J Appl Oral Sci* 2006;14:454-9.
24. Nishi Y. Examination of denture-cleaning methods based on the quantity of microorganisms adhering to a denture. *Gerodontology* 2012;29:259-66.
25. 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. *Gerodontology* 2007;24:217-23.
26. Smith RN, Rawalinsn A, Lath D, Elcock C, Walsh TF, Brook AH. Quantification of dental plaque on lingual tooth surfaces using image analysis: reliability and validation. *J Clin Periodontol* 2004;31:569-573
27. Valentini MF (Assessment of the biofilm formation on the modified surface of acrylic resin and effectiveness of different cleaning protocols) 2016. Thesis Doctorate. Federal University of Pelotas.

28. Barnabé W, Mendonça TN, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil* 2004;31:453-9.
29. de Souza FAC, Paradella TC, Kaga-Ito CY, Jorge AOC. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. *Braz Oral Res* 2009;23:381-5.
30. Rossato MB, Unfer B, May LG, Braum KO. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. *Oral Health Prev Dent* 2011;9:221-7.
31. de Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Souza-Gugelmin MC, Paranhos HFO. Effect of chlorhexidine on denture biofilm accumulation. *J Prosthodont* 2012;21:2-6.
32. de Andrade IM, Cruz PC, da Silva CH, de Souza RF, Paranhos Hde F, Candido RC, Marin JM, de Souza-Gugelmin MC. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and *mutans streptococci* in denture biofilm. *Gerodontology* 2011;28:264-70.
33. Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *J Dent* 2013;41:420-27.
34. Paranhos HFO, Silva-Lovato RF, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil* 2007;34:606-12.
35. Smith, R. N., Brook, A. H. & Elcock, C. The quantification of dental plaque using an image analysis system: *reliability and validation*. *J Clin Periodontol* 2001;28:1158-62
36. Boscato N, Radavelli A, Faccio D, Loguercio AD. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of a soft denture-lining material. *Gerodontology* 2009;26:210-13.

37. Marchini L, Vieira PC, Bossan TP, Montenegro FL, Cunha VP. Self-reported oral hygiene habits among institutionalized elderly and their relationship to the condition of oral tissues in Taubaté, Brasil. *Gerodontology* 2006;23:33-37
38. Iinuma T, Atai Y, Abe Y, Takayama M, Fukumato M, Fukui Y, et al. Denture wearing during sleep doubles the risk of pneumonia in the very elderly. *J Dent Res* 2015;94:28-36.
39. Müller F. Oral hygiene reduces the mortality from aspiration pneumonia in frail elders. *J Dent Res* 2015;94:14-16.
40. Srinivasan M, Gulabani M. A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. *Indian J Dent Res* 2010;21:353-6.
41. Rosa GM; Elizondo ML. New portable system for dental plaque measurement using a digital single-lens reflex camera and image analysis: Study of reliability and validation. *Indian Society of Periodontology* 2015;19:279-84.
42. Susewind S, Lang R, Hahnel S. Biofilm formation and *Candida albicans* morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses* 2015;58:719-27.
43. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS pathogens* 2010; 6.
44. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS microbiology letters*; 2009;299:1-8.
45. O'Donnell LO, Robertson D, Nile CJ, Cross JL, Reggio M, Sherriff A, et al. The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. *PLoS One* 2015; 10: e0137717.

46. Yang X, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z. Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Water Res* 2001; 35:1149-58.
47. Yen JC, Chang FJ, Chang S. A new criterion for automatic multilevel thresholding. *IEEE Trans Image Process* 1995; 4:370–8.
48. Lee SU, Chung SY. A comparative performance study of several global thresholding techniques for segmentation. *Comput. Vision Graphics Image Process* 1990; 52:171-90.
49. Yang X, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z. Quantifying biofilm structure using image analysis. *J Microbiol Methods* 2000; 39:109-11.
50. Silva CH, Pranhos HFO, Ito IY. Biofilm disclosing agents in complete denture: clinical and antimicrobial evaluation. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16:270-5.

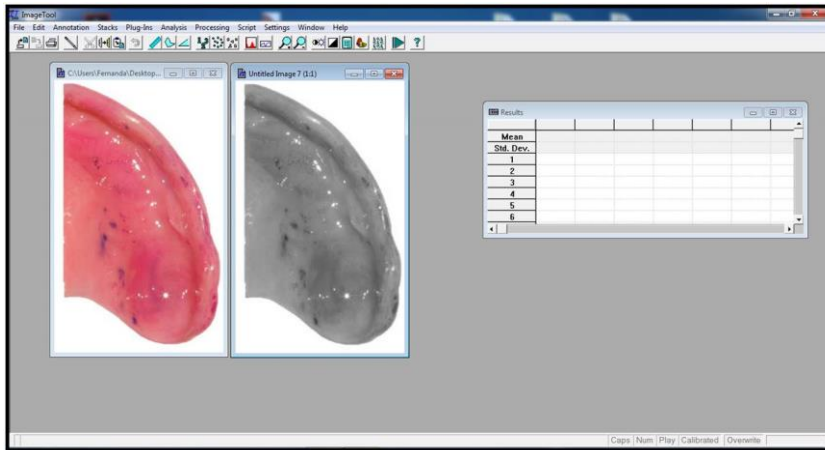


Figure 1. Stained biofilm was measured using an image processing software. Original images were converted to grayscale to be qualified by pixel count in binary scale of histogram.

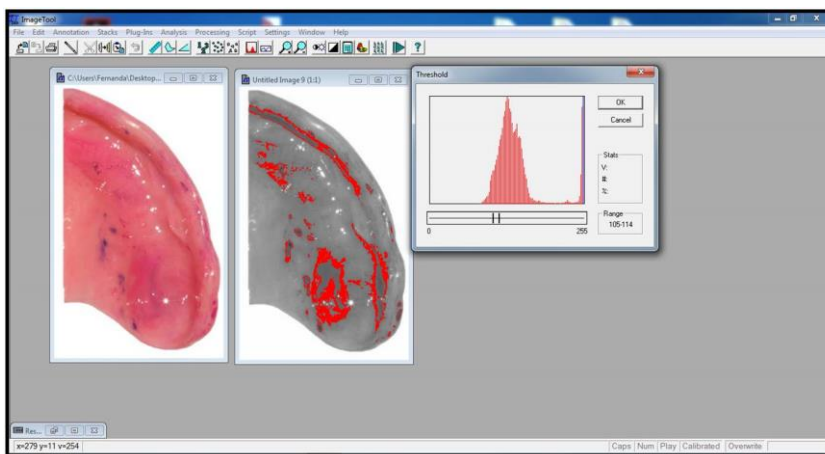


Figure 2. Image was processed using manual threshold tool.

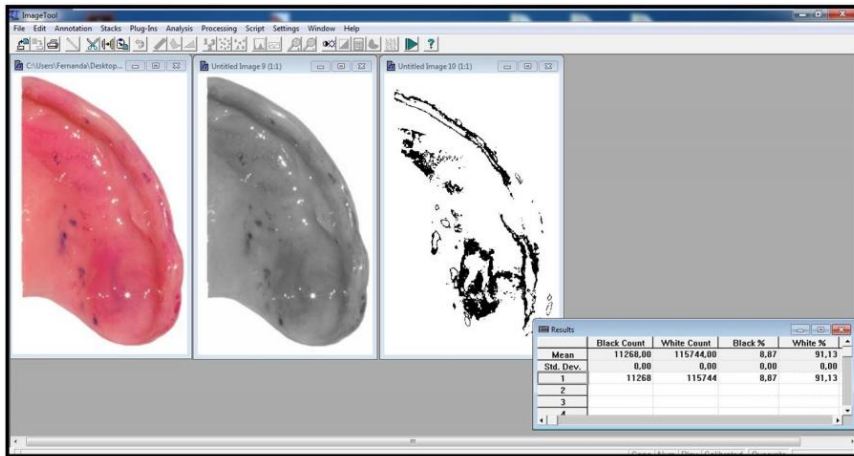


Figure 3. Results were expressed in percentage (pixels count biofilm) of stained area in relation to total area of internal surface of denture base.

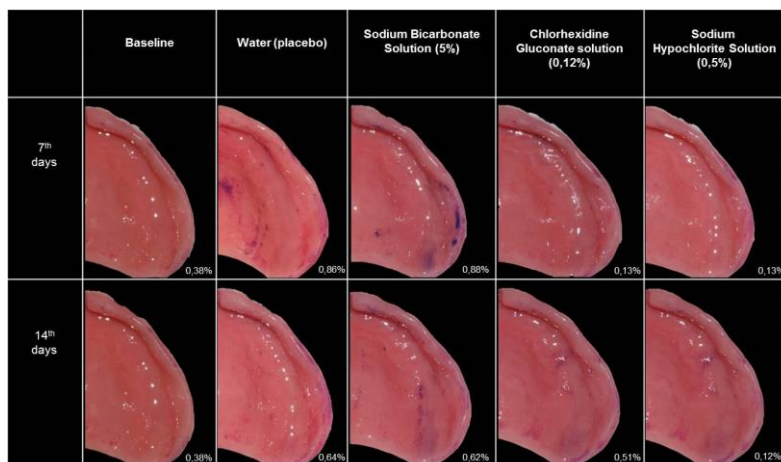


Figure 4. Illustration of stained dentures for same patient for each protocol; below each image percentage the pixels (biofilm) are shown.

Table 1. Mean percentages in biofilm upper complete denture according to image analysis (% pixels/mm², mean $\pm$ SD).

Treatment	Image analysis system	
	7 Days	14 Days
CHX (n=38 /36)	0.8 $\pm$ 1.1b	0.7 $\pm$ 1.4b
NaClO (n=36/38)	0.9 $\pm$ 1.6b	0.6 $\pm$ 0.7b
NaHCO ₃ (n= 36/36)	0.8 $\pm$ 0.8b	1.3 $\pm$ 1.4b
H ₂ O (n=37/ 38)	1.6 $\pm$ 1.5b	1.9 $\pm$ 1.5b

Lower case letters represent statistically significant differences among baseline photographs and days 7 and 14, with more biofilm after 7 and 14 days ($P = .02$). Image analysis showed no statistically significant differences among cleansing protocols ($P > .05$).

Table 2. Total microorganisms count in biofilm according to experimental conditions (CFU/mm², mean $\pm$ SD).

Treatment	Total microorganisms (x10 ⁸)	
	7 days	14 days
CHX (n=38 /36)	0.1 $\pm$ 0.2b	0.3 $\pm$ 0.2b
NaClO (n=36/38)	0.3 $\pm$ 0.9b	0.1 $\pm$ 0.3b
NaHCO ₃ (n= 36/36)	0.6 $\pm$ 0.9a	0.3 $\pm$ 0.6a
H ₂ O (n=37/ 38)	0.6 $\pm$ 1.0a	0.8 $\pm$ 2.0a

Lower case letters represent statistically significant differences among treatments for total microorganisms ($P=.819$). There were differences among treatments ($P<.001$), sodium hypochlorite and chlorhexidine were similar ($P=.819$), both resulting in reduced microbial counts, ($P=.001$) when compared with sodium bicarbonate and water time point assessed

6 Conclusões

Diante do exposto, estabelecer protocolos clínicos de higiene de prótese, bem como orientar o paciente sobre a importância da manutenção da higiene da prótese total é obrigatório. No nosso estudo clínico, o uso de 0,5% de hipoclorito de sódio e 0,12% de gluconato de clorexidina durante 10 min 1 vez por semana, juntamente com escovação 3 vezes ao dia foi uma estratégia adequada para a diminuição da viabilidade bacteriana do biofilme formado em próteses totais, uma vez que resultou na diminuição da contagem de *Streptococcus do grupo mutans* e *Microrganismos totais*.

Diferentes metodologias utilizadas em ensaios clínicos para avaliar a eficácia de agentes químicos de limpeza em prótese total são relatadas. No entanto a análise microbiológica (método objetivo) fornece informações mais confiáveis sobre a eficácia química de limpeza de próteses totais em relação aos sistemas de análise de imagem (método subjetivo). Uma vez que na nossa comparação os dois métodos testados encontraram resultados diferentes. Para a análise microbiológica o uso de hipoclorito de sódio e gluconato de clorexidina são estratégias apropriadas para o controle da diminuição da viabilidade bacteriana sobre o biofilme formado em próteses totais, e para o sistema de análise de imagem não houve diferença entre os protocolos de limpeza.

Referências

ABELSON, D.C. Denture plaque and denture cleansers. **Journal of Prosthetic Dentistry**, n. 45, p. 376-9, 1981.

ASAD, T.; WATKINSON, A.C.; HUGGETT, R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.68, n. 1, p.191-5, 1992.

AMBJORSEN, E.; RISE, J.; HAUGEJORDEN, O. A study of examiner errors associated with measurement of denture plaque. **Acta Odontol Scandinavia**, n.42, p.183-91, 1984.

ANGELILLO, I.F.; BIANCO, A.; NOBILE, C.G.A. et al. Evaluation of the efficacy of glutaraldehyde and peroxygen for disinfection of dental instruments. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.292-296, 1998.

ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. Denture stomatitis: a review. **Journal Oral Rehabilitation**, v.14, n.3, p.217-227, 1987.

AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal Medical Microbiology**, v.55, n. 8, p.999-1008, 2006.

AZUMA, A.; AKIBA, N.; MINAKUCHI, S. Hydrophilic surface modification of acrylic denture base material by silica coating and its influence on *Candida albicans* adherence. **Journal of Medical and Dental Sciences**, n.59, p.1-7, 2012.

AZEVEDO, A. et al. Effect of disinfectants on the hardness and roughness of reline acrylic resins. **Journal Prosthodontic**, v.15, n. 235-42, 2006.

BARBEAU, J.; SEGUIN, J.; GOULET, J. P.; DE KONINCK, L.; AVON, S. L.; LALONDE, B. et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v.95, n.1, p.51-59, 2003.

BARNABÉ, W.; MENDONÇA, N. T.; PIMENTA, F.C.; PEGORARO, L.F.; SCOLARO, J.M. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Journal Oral Rehabilitation**, n. 31, p.453-59, 2004.

BELLON-FONTAINE, M. N.; MOZES, N.; VAN DER MEI, H. C.; SJOLLEMA, J.; CERF, O.; ROUXHET, P. G. et al. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. **Cellular Biophysics**, v.17, n.1, p.93-106, 1990.

BAYSAN, A.; WHILEY, R.; WRIGHT, P.; S. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 79, p. 454-458, 1998.

BRANTING, C.; SUND, M. L.; LINDER, L. E. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, v.34, n.5, p.347-353, 1989.

BRAUN, K.O.; MELLO, J.A.; RACHED, R.N.; DEL BEL CURY, A.A.. Surface texture and some properties of acrylic resins submitted to chemical polishing. **Journal Oral Rehabilitation**, n.30, p-91-98, 2003.

BUDTZ-JØRGENSEN, E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. **The Journal of the American Dental Association**, v.96, n.3, p.474-479, 1978.

BUDTZ-JØRGENSEN, E.; THEILADE, E.; THEILADE, J.; ZANDER, H. A. Method for studying the development, structure and microflora of denture plaque. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.89, n.2, p.149-156, 1981.

BUDTZ-JØRGENSEN, E. Materials and methods for cleaning dentures. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 42, p. 619–623, 1979.

BUDTZ-JØRGENSEN, E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand Journal Dental Research**, n.82, p. 151-90, 1974.

BUDTZ-JØRGENSEN, E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. **The Journal of the American Dental Association**, v. 96, n. 3, p. 474-9, 1978.

BARBEAU, J.; SÉGUIN, J.; GOULET, J.P.; DE KONINCK, L.; AVON, S.L.; LALONDE, B.; et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontic**, v.95, n.1, p.51-9, 2003.

BUSSCHER, H. J.; COWAN, M. M.; VAN DER MEI, H. C. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. **FEMS Microbiology Reviews**, v.8, n.3-4, p.99-209, 1992.

BOSCATO, N.; RADAVELLI, A.; FACCIO, D.; LOGUERCIO, A. D. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of a soft denture-lining material. **Gerodontology**, v.3, n.26, p.210-213, 2009.

BOSCATO, N.; DELAVI, J. D.; MULLER, L.; PEREIRA-CENCI, T.; IMANISHI, S. W. Influence of varnish application on a tissue conditioner: analysis of biofilm adhesion. **Gerodontology**, v.21, n.3, p.207-210, 2010.

CANNON, R. D.; CHAFFIN, W. L. Oral colonization by *Candida albicans*. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.10, n.3, p.359-383, 1999.

CORMACK, B. P.; GHORI, N.; FALKOW, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science**, v. 285, p. 578–582, 1999.

COCO, B.J.; BAGG, J.; CROSS, L.J.; JOSE, A.; CROSS, J.; RAMAGE, G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 377–383, 2008.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; LEIDICH, S. D.; FADDOUL, F. F.; HOYER, L. L.; DOUGLAS, L. J. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. **Journal Dental Research**, v.80, n.3, p.903-908, 2001.

COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J.; BENNETT, D. E.; MORAN, G. P.; BARRY, H. J.; SHANLEY, D. B. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. **AIDS**, v.11, n.5, p.557-567, 1997.

COULTHWAITE, L.; VERRAN, J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. **Journal of Biomedical Science**, v.64, n.4, p.180-189, 2007.

CALDERONE, R.A. Introduction and historical perspectives *Candida* and Candidiasis. **ASM Press**, p.15-25, 2002.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, n.284, p.1318–1322, 1999.

CRAIG, R.G. Inflammation, cardiovascular disease and destructive periodontal diseases. The evolving role of the dental profession. **New York State Dental Journal**, v.70, n.5, p.22-26, 2004.

CRUZ, C.P.; DE ANDRADE, I. M.; PERACINI, A.; SOUZA-GUGELMIN, M.C.M.; SILVA-LOVATO, C.H.; DE SOUZA, R.F.; PARANHOS, H.F.O. The effectiveness of chemical denture cleansers and ultrasonic device in biofilm removal from complete dentures. **Journal of Applied Oral Science**, v.19, n.6, p.668-673, 2011.

CUETO, A.; MARTINEZ, R.; NIKLANDER, S.; DEICHLER, J.; BARRAZA, A.; ESGUEP, A. Prevalence of oral mucosal lesions in an elderly population in the city of Valparaiso, Chile. **Gerodontology**, v. 30, p. 201-206, 2013.

DAVID, C.; ABELSON, D.D.S. Denture plaque and denture cleansers. **Journal Prosthodontic Dentistry**, v. 45, n. 4, 1981.

DE ANDRADE, I.M.; CRUZ, P.C.; DA SILVA, C.H.; DE SOUZA, R.F.; PARANHOS, H.D.E. F.; CANDIDO, R.C.; MARIN, J.M.; DE SOUZA-GUGELMIN, M.C. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and mutant streptococci in denture biofilm. **Gerodontology**, n.28, v.4, p.264-70, 2011.

DE SOUZA, R.F, DE FREITAS OLIVEIRA PARANHOS, H.; LOVATO DA SILVA, C. H.; ABU-NABA'A, L.; FEDOROWICZ, Z.; GURGAN, C. A. Interventions for cleaningdentures in adults. **Cochrane Database Systematic Review**, v.7, n.4, p.CD007395, 2009.

DE SOUZA, R.F, DE FREITAS OLIVEIRA PARANHOS, H.; LOVATO DA SILVA, C. H.; ABU-NABA'A, L.; FEDOROWICZ, Z.; GURGAN, C. A. Interventions for cleaningdentures in adults. **Cochrane Database Systematic Review**. 2015

DAHLAN, A.A.; HAVEMAN, C.W.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; REDDING, S.W. Sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate, and commercial denture cleansers as disinfecting agents against *Candida albicans*: An in vitro comparison study. **General Dentistry**, v.59, n.6, p.224-9, 2011.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167-93.2002.

EDGERTON, M.; SCANNAPIECO, F. A.; REDDY, M. S.; LEVINE, M. J. Human submandibular-sublingual saliva promotes adherence of *Candida albicans* to Polymethyl methacrylate. **Infection and Immunity**, v.61, n.2, p. 2644-2652, 1993.

ELLEPOLA, A.N.; SAMARANAYAKE, L. P. Inhalational and topical steroids, and oral candidosis: a mini review. **Oral Diseases Journal**, v.7, n.4, p.211-216, 2001.

ELLEPOLA, A. N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral candidal infections and antimycotics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, n. 11, p. 172-198, 2000.

ELLEPOLA, A. N. B.; SARAMANAYAKE, L.P. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. **Oral Diseseases**, v. 7, p.11-17, 2001a.

EPSTEIN,J.B. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. **Oral Surgical Oral Medical Oral Pathology**, v.69, n.1, p.32-41, 1990.

EHARA, A.; TORII, M.; IMAZATO, S. Antibacterial activities and release kinetics of a newly developed recoverable controlled agent-release system. **Journal Dental Research**, v.79, p. 824-828, 2000.

EVERAERT, E.J.M.; VAN DE BELT-GRITTER, B.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J.; VERKERKE, G.J.; DIJK, F. In vitro and in vivo microbial adhesion and growth on argon plasma-treated silicone rubber voice prostheses. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n.9, p.147–57,1998.

FERREIRA, M. A.; PEREIRA-CENCI, T.; VASCONCELOS, L. M.; RODRIGUES-GARCIA, R. C.; DEL BEL CURY, A. A. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. **Clinical Oral Investigations**, v.13, n.2, p.237-242, 2009.

FERRETTI, G.A.; RAYBOULD, T.P.; BROWN, A.T.; MACDONALD, J.S.; GREENWOOD, M.; MARUYAMA, Y. et al. Chlorhexidine prophylaxis for chemotherapy- and radiotherapy-induced stomatitis: a randomized double-blind trial. **Oral Surgical Oral Medical Oral Pathology**, v. 69, n.3, p.331-8, 1990.

FIGUEIRAL, M. H.; AZUL, A.; PINTO, E.; FONSECA, P. A.; BRANCO, F. M.; LOVATO, C.H.; PARANHOS, H.F.O.; ITO, I.Y. Aplicação clínica de evidenciadores de biofilme em prótese total. **RPG: Revista Pós-Graduação**, p.7-311, 2000.

GAO, L.; MCCARTHY, T. J. A perfectly hydrophobic surface ($\theta_A/\theta_R = 180$ degrees / 180 degrees). **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.28, p.9052-9053, 2006.

GENDREAU, L.; LOEWY, Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. **Journal of Prosthodontics**, n.20, p. 251-260, 2011.

GIBBONS, R.J.; ETHERDEN, I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. **Infection and Immunity**, n. 41, p. 1190-6, 1983.

GURUVENKET, S.; IYER, G.R.S.; SHESTAKOVA, L.; MORGEN, P.; LARSEN, N.B.; RAO, G.M. Fluorination of polymethylmethacrylate with tetrafluoroethane using DC glow discharge plasma. **Applied Surface Science**, n.254, p. 5722–6, 2008.

GONZALEZ, G.M.; ELIZONDO, M.; AYALA, J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. **Journal Clinical Microbiology**, n. 46, p. 2902–2905, 2008.

HARRISON, Z.; JOHNSON, A.; DOUGLAS, C.W. An *in vitro* study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. **Journal Oral Rehabilitation**, v. 31, n.5, p. 460-7, 2004.

HAGERTY, J.A.; ORTIZ, J.; REICH, D.; MANZARBEITIA, C. Fungal infections in solid organ transplant patients. **Surgical Infections (Larchmont)**, n. 4, p.263-271, 2003.

HIROTA, K.; MURAKAMI, K.; NEMOTO, K.; MIYAKE, Y. Coating of a surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) co-polymer significantly reduces retention of human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiol Lett**, v.248, p. 37-45, 2005.

HODAK, S.K.; SUPASAI, T.; PAOSAWATYANYONG, B.; KAMLANGKLA, K.; PAVARAJARN, V. Enhancement of the hydrophobicity of silk fabrics by SF₆ plasma. **Applied Surface Science**, n. 254, p. 4744-9, 2008.

HOPE, C.K.; CLEMENTS, D.; WILSON, M. Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. **Journal of Applied Microbiology**, n. 93, p.448-455, 2002.

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

ISHIHARA, K.; OSHIDA, H.; ENDO, Y. Hemocompatibility of human whole blood on polymers with a phospholipid polar group and its mechanism. **Journal Biomed Mater Reseach**, n. 26, p. 1543-1552, 1992.

IWASAKI, Y.; NAKABAYASHI, N.; ISHIHARA, K. *In vitro* and *ex vivo* blood compatibility study of 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) copolymer-coated hemodialysis hollow fibers. **Journal of Artificial Organs**, n. 6, p. 260-266, 2003.

JAGGER, D.C.; HARRISON, A. Denture cleansing-the best approach. **Brasilian Dental Journal**, n. 178, p. 413-7, 1995.

JORGENSES, E.B.; BERTRAM, U. The etiology in relation to trauma and infection. **Acta Odontologica Scandinavica**, n.28, p.71-92, 1970.

KANT, A. A.; SEDEV, R.; RALSTON, J. Thermally and photoinduced changes in the water wettability of low surface-area silica and titania. **Langmuir**, n. 21, p. 2400-7, 2005.

KINYON, T. J.; SCHWARTZ, R. S.; BURGESS, J.O.; BRADLEY, D.V. The use of warm solutions for more rapid disinfection of prostheses. **The International Journal of Prosthodontics**, v. 2, p. 518-523, 1989.

KINNIMENT, S.L.; WIMPENNY, J.W.; ADAMS, D.; MARSH, P.D. Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. **Microbiology**, n.142, p. 631-638, 1996.

KLOTZ, S.A.; DRUTZ, D.J.; ZAJIC, J.E. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. **Infection and Immunity**, n.50, p.97-101, 1985.

KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **Journal Oral Rehabilitation**, v. 29, n. 3, p.300-4, 2002.

KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **Journal Oral Rehabilitation**, v.29, p. 300-304, 2002.

KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 17, p. 255-267, 2004.

LAI, J.; SUNDERLAND, B.; XUE, J. et al. Study of hydrophilicity of polymer surfaces improved by plasma treatment. **Applied Surface Science**, v. 252, p.3375-9, 2006.

LASS-FLÖRLE, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, n.52, p. 197-205, 2009.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. **Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica**, v.110, n.9, p.601-610, 2002.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.4, p. 999-1007, 2001.

LIMEBACH, H. Implications of oral infections on systemic diseases in the institutionalized elderly with a special focus on pneumonia. **Annals of Periodontology**, v.3, p.262-75, 1998.

LI, L.; FINNEGAN, M. B.; O'ZKAN, S.; KIM, Y., LILLEHOJ, P. B.; HO, C. M.; LUX, R. MITO, R.; LOEWY, Z.; SHI, W. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. **Molecular Oral Microbiology**, n.25, v.6, p.384-90, 2010.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. **APMIS**, v. 110, p. 601–610, 2002.

LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. **Journal Dental Research**, v. 86, p. 204–215, 2007.

MINAGI, S.; MIYAKE, Y.; INAGAKI, K.; TSURU, H.; SUGINAKA, H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun* 1985; 47: 11-4. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p. 881-90, 2002.

MA FERREIRA, M. A.; PEREIRA-CENCI, T.; RODRIGUES DE VASCONCELOS, L. M.; RODRIGUES-GARCIA, R.C., DEL BEL CURY, A.A. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. **Clinical Oral Investigations**, v.13, p.237-242, 2009.

MOORE, T.C.; SMITH, D.E.; KENNY, G.E. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. **Journal of Prosthetic Dentistry**, n. 52, v. 2, p.158-63, 1984.

MCCABE, J.F.; MURRAY, I.D.; KELLY, P.J. The efficacy of denture cleansers. **The European Journal Prosthodontics and Restorative Dentistry**, v.4, n.3, p.203-07, 1995.

MARTINS SILVA, E.M.; ZAVANELLI, A.C.; SILVA FILHO, C.E.; RODRIGUES, J.E. Metodologia para quantificar indutores em pacientes portadores de próteses totais. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 53, n.1, p. 5-7, 1996.

MURALI, S.; MANISH, G. A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. **Indian Journal of Dental Research**, v.21, n. 3, p. 353-356, 2010.

NAKAMOTO, K.; TAMAMOTO, M.; HAMADA, T. Evaluation of denture cleansers with and without enzymes against *Candida albicans*. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 66, p. 792-5, 1991.

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

NIKAWA, H.; YAMAMOTO, T.; HAMADA, T.; RAHARDJO, M.B.; MURATA, H. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. **Journal Oral Rehabilitation**, v.24, p.350–7, 1997.

NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; KUMAGAI, H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. **Intian Journal Prosthodontics**, v. 12, p.153–159, 1999.

NEILL, D.J. A study of materials and methods employed in cleansing dentures. **Brasian Dental Journal**, v.124, p.107-15, 1968.

NETT, J.; LINCOLN, L.; MARCHILLO, K.; MASSEY, R.; HOLOYDA, K.; HOFF, B.; VANHANDEL, M.; ANDES, D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrobiology Agents Chemother**, v. 51, n.2, p. 510–520, 2007.

NEWBRUN, E. The use of sodium bicarbonate in oral hygiene products and practice. **Compend Contin Educ Dent Suppl**, v.18, n.21, p.2-7, 1997

ODMAN, P. A. The effectiveness of an enzyme-containing denture cleanser. **Quintessence International**, v. 23, p. 187–190, 1992.

OLIVEIRA, V.M.; LEON, B.L.; DEL BEL CURY, A.A.; CONSANI, S. Influence of number and position of flasks in the monomer release, Knoop hardness and porosity of a microwave-cured acrylic resin. **Journal Oral Rehabilitation**, n.30, p.1104-1108, 2003.

OLIVEIRA, Adauê. **Efeito de cobertura antiaderente no acúmulo de biofilme em dispositivos ortodônticos** 2012. 33f. Dissertação (Dissertação em Clínica Odontológica)- Faculdade de odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

OGAWA, R.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K. Domain-controlled polymer alloy composed of segmented polyurethane and phospholipid polymer for biomedical applications. **Science and Technology of Advance Materials**, n. 4, p. 523–530, 2003.

PARANHOS, H.F.O.; et al. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. **Journal Oral Rehabilitation**, n. 34, p. 606-612, 2007.

PARK, S.E.; PERIATHAMBY, A.R.; LOZA, J.C. Effect of surface charged

poly(methylmethacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. **Journal Prosthetic**, n.12, p. 249–54, 2003.

PARK, S.E.; BLISSETT, R.; SUSARLA, S.M.; WEBER, H.P. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. **Journal Prosthodonty**, n.17, p. 365–9, 2008.

PAVARINA, A.C.; MACHADO, A.L.; GIAMPAOLO, E.T.; VERGANI, C.E. Effects of chemical disinfectants on the transverse strength of denture base acrylic resins. **Journal Oral Rehabilitation**, v. 30, n.11, p.1085-9, 2003.

PURI, G.; BERZINS, D.W.; DHURU, V.B. et al. Effect of phosphate group addition on the properties of denture base resins. **Journal of Prosthetic Dentistry**, n.100, p.302-8, 2008.

PETERSEN, P.E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dentistry and oral epidemiology**, v.31, n.s1, p. 3-24, 2003.

PEREIRA-CENCI, T.; DENG, D.M.; KRANEVELD, E.A.; MANDERS, E.M.; DEL BEL CURY, A. A.; TEN CATE, J. M. et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. **Archives of Oral Biology**, v.45, n.8, p.755-764, 2008.

PEREIRA-CENCI, T.; CURY, A. A.; CENCI, M. S, RODRIGUES-GARCIA, R.C. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. **International Journal Prosthodontic**, v. 20, p. 308-310, 2007.

PEREZOUS, L. F.; FLAITZ, C. M.; GOLDSCHMIDT, M. E; ENGELMEIER, R. L. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. **Journal Prosthetic Dentistry**, v.93, n.3, p.288-293, 2005.

RAMAGE, G.; TOMSETT, K.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; REDDING, S. W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontics**, v.98, n.1, p.53-59, 2004.

RANGEL, E.C.; GADIOLI, G.Z.; CRUZ, N.C. Investigations on the stability of plasma modified silicone surfaces. **Plasmas Polym**, n.9, p. 35-48, 2004.

RANGEL, E.C.; BENTO, W.C.A.; KAYAMA, M.; SCHREINER, W.H.; CRUZ, N.C. Enhancement of polymer hydrophobicity by SF6 plasma treatment and argon plasma immersion ion implantation. **Surface Interface Anal**, n.35, p.179-83, 2003.

ROSAN, B.; LAMONT, R. J. Dental plaque formation. **Microbes and Infection**, v.2, n.13, p.1599-1607, 2000.

ROBINSON, G.N.; KEBABIAN, P.L.; FEEDMAN, A.; DEPALMA, V. Temperature-dependent surface potentials of fluorinated alkanethiolate self-assembled monolayers. **Thin Solid Films**, n. 310, p. 24-8, 1997.

SAMARANAYAKE, L.P.; MCCOURTIE, J.; MACFARLANE, T.W. Factors affecting th in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. **Archives of Oral Biology**, v.25, n.8-9, p.611-615, 1980.

SAMARANAYAKE, L.P.; FURGUSON, M.M. Delivery of antifungal agents to the oral cavity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.13, n.1-2, p.161-179, 1994.

SAMARANAYAKE, L.P.; FIDEL, P.L.; NAGLIK, J.R.; SWEET, S.P. TEANPAISAN, R.; COOGAN, M.M.; BLIGNAUT, E.; WANZALA, P. Fungal infections associated with HIV infection. **Oral Diseases**, n.8, p. 151–160, 2002.

SARAH, R.; SHEEN, B.D.S.A.; ALAN HARRISON. Assessment of plaque prevention on dentures using an experimental cleanser. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, n.6, v.84, 2000.

SCULLY, C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.34, n.6, p. 448-455, 2007.

SHMACK, G.; DUTSCHK, V.; PISANOVA, E. Modification of polyamide fibres to improve their biocompatibility. **Fibre Chemistry**, n.32, p.48-55, 2000.

SILVA, F.C.; et al. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. **Journal Prosthodont**, n. 17, p. 627-633, 2008.

SILVA, C. H.; PARA NHOS, H. de O.; ITO, I.Y. Biofilm disclosing agents in complete denture: clinical and antimicrobial evaluation. **Pesquisa Odontologica Brasileira**, v.16, n.3, p.270-275, 2002.

SILVA-LOVATO, C. H.; PARANHOS, H. F .O. Efficacy of biofilm disclosing agent and of three brushes in the control of complete denture cleansing. **Journal of Applied Oral Science**, n. 14, p. 454-459, 2006.

SISSONS, C.H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Advances in Dental Research**, n.11, p. 110-126, 1997.

SISSONS, C.H.; CUTRESS, T.W.; HOFFMAN, M.P.; WAKEFIELD, J.S. A multistation dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. **Journal Dental Research**, n. 70, p. 1409-1416, 1991.

SIPAHI C, A. N.; BAYRAMLI, E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. **Journal Dentistry**, n. 29, p.197-204, 2001.

SILHACEK, K.J.; TAAKE, K.R. Sodium bicarbonate and hydrogen peroxide: the effect on the growth of *Streptococcus mutans*. **Journal of Dental Hygiene**, v.79, n.4, 2005.

SOUSA, F.A.; PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. **Brazilian Oral Research**, v.23, n.4, p. 381-5, 2009.

SHMACK, G.; DUTSCHK, V.; PISANOVA, E. Modification of polyamide fibres to improve their biocompatibility. **Fibre Chemistry**, n.32, p.48-55, 2000.

SUANPOOT, P.; KUESENG, K.; ORTMANN, S.; et al. Surface analysis of hydrophobicity of Thai silk treated by SF6 plasma. **Surf Coatings Technology**, n.202, p.5543-9.2008.

SRINIVASAN, M.; GULABANI, M.A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. **Indian Journal of Dental Research**, v. 21, n. 3, p.352-236, 2010.

SHEEN, S.R.; HARRISON, A. Assessment of plaque prevention on dentures using an experimental cleanser. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.84, p. 594-601, 2000.

MURALI, S.; MANISH, G. A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. **Indian Journal of Dental Research**, n.21, v. 3, p. 353-356, 2010.

TAHMOURESPOUR A, KERMANSHAHI, RK, SALEHI R, et al. The relationship between cell surface hydrophobicity and antibiotic resistance of streptococcal strains isolated from dental plaque and Caries. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, n. 10, p. 251-55, 2008.

VAN DER MAAREL, W.C.D.; VANOBBERGEN, J.N.; BRONKHORST, E.M.; SCHOLS, J.M.; DE BAAT, C. Oral health care and aspiration pneumonia in frail older people: a systematic literature review. **Gerodontology**, v 30, p. 3-9, 2013.

VERRAN, J.; MARYAN, C.J. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. **Journal Prosthet Dentistry**, v. 77, p.535-9, 1997.

VIEIRA, C.P.A.; SENNA, M.P.; SILVA, J.W.; DEL BEL CURY, A.A Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida* spp. Biofilm recolonization on liner surface, **Brazilian Oral Research**, n.24, v.3, p.342-8, 2010.

WALKER, D.M.; STAFFORD, G.D.; HUGGETT, R.; NEWCOMBE, R.G. The treatment of denture-induced stomatitis. Evaluation of two agents. **Brazilian Dental Journal**, n. 151, p. 416-9, 1981.

WEBB, B. C.; THOMAS, C. J.; WILLCOX, M. D.; HARTY, D. W.; KNOX, K. W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1.

Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Australian Dental Journal**, v.43, n.1 p.45-50, 1998.

WILSON, M.; PATEL, H.; FLETCHER, J. Susceptibility of biofilms of *Streptococcus sanguis* to chlorhexidine gluconate and cetylpyridinium chloride. **Oral Microbiology Immunology**, n. 11, p.188-192, 1996.

WYSZECKI, G.; STILES, W.S. Color science: concepts and methods, quantitative data and formulae. **InterScience**, v.168, n.223, p.13-116, 1982.

ZAREMBA, M. L.; DANILUK, T.; ROZKIEWICZ, D.; CYLWIK-ROKICKA, D.; KIERKLO, A.; TOKAJUK, G.; et al. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. **Advances in Medical Sciences**, v.51, n.1, p.233-236, 2006.

ZAMPERINI, C.A.; MACHADO, A.L.; VEGANI, C. E.; PAVARINA, A.C.; RANGEL, E.C.; CRUZ, N.C. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified Polymethyl methacrylate. **Mycoses**, n.54, p.344-351, 2010.

YOSHIIJIMA, Y.; MURAKAMI, K.; KAYAMA, S.; LIU, D.; HIROTA, K.; ICHIKAWA, T.; MIYAKE, Y. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. **Mycoses**, v.53, n.3, p.221-6, 2010.

YILDIRIM, M.S.; HASANREISOGLU, U.; HASIRCI N, SULTAN, N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. **Journal Oral Rehabilitation**, n.32, p. 518-25, 2005.

YILMAZ, H.; AYDIN, C.; BAL, B. T.; OZÇELİK, B. Effects of disinfectants on resilient denture-lining materials contaminated with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, and *Candida albicans*. **Quintessence International**, v. 36, n.5, p.373-81, 2005.

Apêndices

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Parte 1)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está convidado a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis. Alertamos que não existem riscos envolvidos neste estudo e em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Esclarecemos que a participação é decorrente de sua livre decisão, após receber todas as informações que julgar necessárias, e que poderá ser a qualquer tempo, retirada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Formação de biofilme sobre superfícies modificadas de resina acrílica e efetividade de diferentes protocolos de higienização

Pesquisadora participante: Fernanda Valentini

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci, Prof. Maximiliano Sérgio Cenci, Profa. Dra. Noéli Boscato

Prezado paciente, nossa pesquisa tem como objetivo principal avaliar sua saúde bucal, principalmente em relação a presença de *Candida* e a influência deste fungo na formação de biofilme, ou seja placa bacteriana. Para isso, será realizada coleta de biofilme da sua mucosa oral e próteses utilizando um swab esterelizado,

que é semelhante a um grande cotonete e coleta de sua saliva, após a estimulação da mesma. A coleta do material quanto será realizada na Faculdade de Odontologia. Será preservada a identidade e os resultados individuais não serão divulgados. A tua participação é de extrema importância para que possamos estabelecer medidas preventivas a essa colonização.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO E RESPONSÁVEL LEGAL

Eu, _____, RG/CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo para avaliar a saúde bucal, principalmente em relação a presença de *Candida* e a influência deste fungo na formação de biofilme, ou seja placa bacteriana. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, e os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento/ assistência/tratamento.

Pelotas, ____ de _____ de 2012.

Assinatura

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Parte 2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está convidado a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis. Alertamos que não existem riscos envolvidos neste estudo e em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Esclarecemos que a participação é decorrente de sua livre decisão, após receber todas as informações que julgar necessárias, e que poderá ser a qualquer tempo, retirada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Formação de biofilme sobre superfícies modificadas de resina acrílica e efetividade de diferentes protocolos de higienização

Pesquisadora participante: Fernanda Valentini

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci, Prof. Maximiliano Sérgio Cenci, Profa. Dra. Noéli Boscato

Prezado paciente, a nossa pesquisa tem como objetivo principal, avaliar adesão da placa bacteriana que se forma sobre a superfície de diferentes materiais usados para fazer sua dentadura. Nós vamos avaliar ao longo do tempo vários micróbios que estarão presentes na dentadura, coma a *Candida*, que é um fungo comum na cavidade bucal e que causa doença em alguns casos específicos, como

por exemplo quando a dentadura fica muito tempo sem ser trocada ou sem adequada limpeza. Para isso será realizado um estudo clínico em sua prótese total (dentadura) superior antiga ao mesmo tempo em que se realizam as etapas clínicas para confecção de uma nova prótese total. O material estudado será colocado na parte de dentro de sua dentadura antiga sem provocar qualquer desconforto ou risco para ver se nele vai grudar menos micróbios. Você terá que retornar à Faculdade de Odontologia da UFPel após passados 24 h , 28 h e 7 dias para que possamos remover os materiais testados. Ao final lhe será fornecida uma nova prótese total superior, sem custos.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO E RESPONSÁVEL LEGAL

Eu, _____, RG/CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo sobre a avaliação clínica da formação de biofilme em materiais modificados realizado na clínica de prótese dentária do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Pelotas, ____ de _____ de 2012.

Assinatura

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Parte 3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está convidado a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis. Alertamos que não existem riscos envolvidos neste estudo e em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Esclarecemos que a participação é decorrente de sua livre decisão, após receber todas as informações que julgar necessárias, e que poderá ser a qualquer tempo, retirada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Formação de biofilme sobre superfícies modificadas de resina acrílica e efetividade de diferentes protocolos de higienização

Pesquisadora participante: Fernanda Valentini

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci, Prof. Maximiliano Sérgio Cenci, Profa. Dra. Noéli Boscato

Prezado paciente, a nossa pesquisa tem como objetivo principal, avaliar qual é o melhor jeito de limpar sua dentadura, levando em conta como ela fica e quais micróbios ela mata. Para isso será realizado um estudo clínico com a prótese total (dentadura) que tu usas, onde testaremos diferentes formas de limpar a dentadura (protocolos de higienização de próteses). Todos esse protocolos são utilizados por

diversas pessoas e nenhum causa mal, só não sabemos ainda qual é o melhor deles. Tu receberás todo o material e instruções necessária para executar uma boa higiene oral e deverá retornar à Faculdade de Odontologia da UFPel após passados 7 dias e 14 dias para que possamos bater fotografias das dentaduras, ver como ficou a limpeza e te perguntar o que achaste de usar este método.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO E
RESPONSÁVEL LEGAL

Eu, _____, RG/ CI
_____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo sobre limpeza de dentaduras realizado na clínica de prótese dentária do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Pelotas, ____ de _____ de 2012.

Assinatura

Apêndice B – Notas de Tese

Avaliação da efetividade de diferentes protocolos de higienização

Assesment of effectiveness of the different cleaning protocols

A presente tese de doutorado desenvolveu um ensaio clínico randomizado em usuário de prótese total, a fim de buscar o melhor protocolo químico de higienização de próteses totais, bem como comparar duas metodologias diferentes usadas com esse propósito. O biofilme formado na parte interna da prótese total e na região vestibular dos pré-molares foi coletado e corado para quantificação e comparação das metodologias após diferentes protocolos químicos em T0, T7 e T14. Para análise microbiológica, a solução de 0,5% de hipoclorito de sódio e a solução de 0,12% de gluconato de clorexidina reduziram os níveis de microrganismos comparado com a solução de 5% de bicarbonato de sódio e da água (placebo). Sendo estes, recomendados no auxílio químico da higiene de próteses totais, através da imersão uma vez por semana durante 10 minutos. Quando comparamos duas metodologias diferentes para quantificação de biofilme e análise de produtos químicos de higiene, comprovamos que a análise microbiológica fornece resultados mais sensíveis e reproduzíveis em relação à análise computadorizada de fotografias coradas. Levando em consideração os aspectos éticos relacionados experimentação in vivo, nossos achados tem a capacidade de servir como modelo de novos estudos bem como protocolo clínico de higiene para pacientes usuários de prótese total.

Campo da pesquisa: Clínica Odontológica, Prótese Dentária.

Candidato: Fernanda Valentini Mioso, Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal de Pelotas (2010)

Data da defesa e horário: 22/02/2016

Local: Auditório do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. 5º andar da Faculdade de Odontologia de Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457.

Membros da banca: Prof. Dra. Françoise Hélène van de Sande Leite, Prof. Dra. Aline Pinheiro de Moraes, Profa. Dra. Giana da Silveira Lima, Prof. Dr. Mateus Bertolini Fernandes dos Santos, Prof. Dr. Prof. Dr. Jovito Adiel Skupien (suplente) e Rafael Guerra Lund (Suplente).

Orientador: Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci

Co-orientadores: Profa. Dra. Noéli Boscato e Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci

Informação de contato: Fernanda Valentini Mioso, nandavalentini@hotmail.com, Rua Treze de Maio 1604/151 harmonia – Caxias do Sul/RS.

Apêndice C – Súmula do currículo do candidato

Fernanda Valentini Mioso, nasceu em 25 de maio de 1986, em Ijuí, Rio Grande do Sul. Completou o ensino fundamental em escola pública e o ensino médio em escola privada na mesma cidade. No ano de 2003 ingressou na Universidade de Odontologia de Passo Fundo (UPF), transferiu em 2005 para Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), tendo sido graduada cirurgiã-dentista em 2010. No mesmo ano ingressou no Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), área de concentração Prótese Dentária, sob orientação do Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci. Durante o período de mestrado foi bolsista CAPES, e desenvolveu trabalhos na interface prótese total, resina acrílica, reembasadores resiliente e biofilme. Tornou-se especialista em Prótese Dentária pelo Conselho Federal de Odontologia do Rio Grande do Sul, em 2012. No mesmo ano, ingressou no Doutorado no Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), área de concentração Dentística, sob orientação do Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci. Desenvolveu trabalhos na interface clínica odontológica, levantamento epidemiológico, ensaio clínico randomizado, higiene oral, biofilme e prótese total. Durante o período acadêmico fez diversos projetos de extensão em clínica odontológica com ênfase em Prótese Dentária. Ainda em 2012 ingressou no Exército Brasileiro, 9º BIMTZ- na cidade de Pelotas, exercendo clínica especializada (Prótese Dentária). Em 2014 concluiu a especialização em Implantodontia na Universidade Cruzeiro do Sul (grupo Ideal cursos) na cidade de Pelotas. Em 2015 foi transferida para o 19º BIMTZ na cidade de São Leopoldo, por interesse próprio.

Publicações:

Antibacterial efficacy and effect of chlorhexidine mixed with irreversible hydrocolloid for dental impressions: a randomized controlled trial. Cubas ABC, Valentini F, Leite FRM, Camacho B, Cenci MS, Pereira-Cenci T. *Journal of Prosthodontics*, v27. p363-365. 2014.

Influence of glass particle size of resin cements on bonding to glass ceramic: SEM and bond strength evaluation. Valentini F, Moraes RR, Pereira Cenci T, Boscato N *Microscopy Research and Technique (Print)* 2014.

Can we close large prosthetic space with orthodontics?. International Journal of Orthodontics. Meski EM, Skupien J, Valentini F, Pereira-Cencil T. *International Journal of Orthodontics*. 2013.

Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. *Journal of Dentistry*. 2013.

Prevention and treatment of Candida colonization on denture liners: A systematic review. Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Journal of Prosthetic Dentistry.2013.

Resilient Attachments as an Alternative to Conventional Cast Clasp Removable Partial Denture: 3-Year Follow-up. Schuh C, Skupien JA, Mesko EM, Valentini F, Pereira-Cenci T, Boscato N. The Journal of Indian Prosthodontic Society. 2013.

Effect of Surface Sealant on the Color Stability of Resin Composite Restoration. Valentini F, Oliveira DGS, Guimarães ZG, Barbosa SPR, Moraes RR. Brazilian Dental Journal. 2011.

Apêndice D - Questionário semi-aberto (parte 3)

Dados pessoais

1. Nome completo: _____
2. Endereço: _____
3. Telefones Residencial () _____ Comercial: () _____ Celular: () _____
4. Sexo: () Masculino () Feminino
5. Data de nascimento ____/____/____

Conte-nos sobre suas próteses:

Há quanto tempo utiliza prótese total?

() menos de 6 meses () De 6 meses a 2 anos () De 5 a 10 anos () Mais de 10 anos

Você dorme com suas próteses?

() Sim () Não

Como você realiza a higiene da sua prótese?

() Escova macia e pasta de dentes () Escova dura e pasta de dentes () Apenas escova e água () Utilizo solução limpadora Qual? _____

Conte-nos sobre sua saúde:

Possui alguma doença ou está sob tratamento médico? () Sim () Não

Qual(is)? _____

Toma algum remédio? () Sim () Não

Qual(is)? _____

É diabético? () Sim () Não

Utiliza medicação para controle da diabetes? () Sim () Não

Utiliza complexo vitamínico? () Sim () Não Qual(is)? _____

Você já fez ou faz quimioterapia?

() Sim () Não Por quanto tempo? _____

Você fuma?

() Sim () Não () fumava

Quanto tempo parou? _____

Com qual frequência? _____

Apêndice E- Instruções sobre o Projeto

Parte 2

Novembro, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROJETO DE PESQUISA
MESTRADO EM PRÓTESE DENTÁRIA

INSTRUÇÕES DE HIGIENE ORAL

Cuidados Especiais Durante o Estudo

- Você não poderá utilizar líquido para bochecho durante as fases do estudo;
- Você não poderá fazer uso de medicamentos como antibióticos e antifúngicos durante as fases do estudo;
- CASO OCORRA ALGUMA DESSAS RESTRIÇÕES DURANTE AS FASES DO ESTUDO, IMEDIATAMENTE RELATE AO DENTISTA TAL USO.

ALGUNS CUIDADOS COM A PRÓTESE

- 1*) VOCÊ DEVERÁ SE ALIMENTAR NORMALMENTE COM A SUA PRÓTESE DURANTE O ESTUDO. NÃO É PRECISO MUDAR SEUS HÁBITOS ALIMENTARES.
- 2*) VOCÊ DEVERÁ REMOVER SUA PRÓTESE RIGOROSAMENTE TRÊS VEZES AO DIA PARA HIGIENIZAÇÃO.
 
- 3*) NO LOCAL DA PESQUISA USAR APENAS A ESPUMA FORMADA PELA PASTA DE DENTE PARA HIGIENIZAÇÃO. VOCÊ NÃO DEVE ESCOVAR COM A ESCOVA DE DENTE NESTA REGIÃO. JÁ OS DEMAIS DENTES DEVEM SER ESCOVADOS NORMALMENTE.
- 4*) VOCÊ DEVERÁ DORMIR COM A PRÓTESE, E EM MOMENTO ALGUM, FICAR SEM USÁ-LAS.
 

DIAS DAS CONSULTAS PRÉ-DETERMINADAS:

1ª FASE	DATA
24 horas	
48 horas	
7 dias	
PROTESES NOVAS	

COMPROMISSO

- 1*) CONTAMOS COM O SEU COMPROMETIMENTO ASSIM COMO PODERÁ CONTAR COM O NOSSO.
- 2*) TODAS AS CONSULTAS PRÉ- DETERMINADAS SÃO IMPORTANTÍSSIMAS PARA NOSSA PESQUISA. PORTANTO, NÃO PODEM SER FALTADAS. QUALQUER EVENTUALIDADE AVISE O QUANTO ANTES.

Responsável Fernanda Valentini tel. (53)3229-1809 ou (53) 8129-5552.

Apêndice F- Instruções sobre o Projeto

Parte 3

Novembro, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROJETO DE PESQUISA
MESTRADO EM PRÓTESE DENTÁRIA

INSTRUÇÕES DE HIGIENE ORAL

Cuidados Especiais Durante o Estudo

- Você não poderá utilizar líquido para bochecho bucal durante as fases do estudo;
- Você não poderá fazer uso de medicamentos como antibióticos e antifúngicos durante as fases do estudo;
- CASO OCORRA ALGUMA DESSAS RESTRIÇÕES DURANTE AS FASES DO ESTUDO, IMEDIATAMENTE RELATE AO DENTISTA TAL USO.

ALGUNS CUIDADOS COM A PRÓTESE

- 1*) VOCÊ DEVERÁ SE ALIMENTAR NORMALMENTE COM A SUA PRÓTESE DURANTE O ESTUDO. NÃO É PRECISO MUDAR SEUS HÁBITOS ALIMENTARES.
- 2*) VOCÊ DEVERÁ REMOVER SUA PRÓTESE RIGOROSAMENTE, TRÊS VEZES AO DIA PARA HIGIENIZAÇÃO.
- 3*) VOCÊ DEVERÁ SEGUIR O PROTOCOLO DE HIGIENIZAÇÃO PROPOSTO A CADA FASE. SERÃO 4 PROTOCOLOS TESTADOS EM TEMPOS DIFERENTES DURANTE 14 DIAS CADA.
- 4*) VOCÊ DEVERÁ DORMIR COM A PRÓTESE, E EM MOMENTO ALGUM, FICAR SEM USÁ-LAS.




DIAGRAMA DAS CONSULTAS PRÉ-ESTABECIDAS:
PROTOCOLO DE HIGIENIZAÇÃO

1ª FASE	DATA
1º PROTOCOLO DE HIGIENIZAÇÃO	14 DIAS
ESPERA	7 DIAS
2º PROTOCOLO DE HIGIENIZAÇÃO	14 DIAS
ESPERA	7 DIA
3º PROTOCOLO DE HIGIENIZAÇÃO	14 DIAS
ESPERA	7 DIA
4º PROTOCOLO DE HIGIENIZAÇÃO	14 DIAS
TOTAL DA PESQUISA	78 DIAS

COMPROMISSO

- 1*) CONTAMOS COM O SEU COMPROMETIMENTO ASSIM COMO PODERÁ CONTAR COM O NOSSO.
- 2*) TODAS AS CONSULTAS PRÉ-DETERMINADAS SÃO IMPORTANTÍSSIMAS PARA NOSSA PESQUISA. PORTANTO, NÃO PODEM SER FALTADAS. QUALQUER EVENTUALIDADE AVISE O QUANTO ANTES.

Responsável Fernanda Valentini tel. (53)3229-1809 ou (53) 8129-5552.

Apêndice G- Questionário de Satisfação (parte 3)

De sua nota de 1 a 5, sendo 1 muito ruim e 5 muito bom:

1. Você sentiu alguma diferença após realizar do protocolo de higienização?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

2. Teve dificuldade em realizar o protocolo higienização?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

3. Teve gosto ruim ao realizar o protocolo de higienização?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

4. Teve alteração do paladar enquanto realizava o protocolo de higienização?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

5. Teve algum tipo de sensibilidade na mucosa bucal durante a realização do protocolo de higienização?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5



Anexos

Anexo A- Aprovação do Comitê de Ética

Parte 3



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

PELOTAS, 19 de janeiro de 2010.

PARECER Nº 140/2009

O projeto de pesquisa intitulado **AValiação de Métodos Físicos e Químicos de Higiene de Próteses – Estudo In Vivo** está constituído de forma adequada, cumprindo, na suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Torriani", is written over a horizontal line.

Prof.º Marcos Antonio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPel

Prof. Marcos A. Torriani
Coordenador
Comitê de Ética e Pesquisa

