



**UNINGÁ – CENTRO UNIVERSITÁRIO INGÁ
MESTRADO PROFISSIONALIZANTE EM ODONTOLOGIA**

ANA PAULA DE CAMPOS PAGANELLI

**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO PLASMA DE BAIXA
TEMPERATURA E AGENTES QUÍMICOS DE LIMPEZA SOBRE BIOFILME DE *C.
ALBICANS* SOBRE RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESES DENTÁRIAS**

**MARINGÁ
2018**



ANA PAULA DE CAMPOS PAGANELLI

**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO PLASMA DE BAIXA
TEMPERATURA E AGENTES QUÍMICOS DE LIMPEZA SOBRE BIOFILME DE *C.
ALBICANS* SOBRE RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESES DENTÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Centro
Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Odontologia, subárea Prótese Dentária.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ferruzzi
Lima

MARINGÁ

2018

RESUMO

Declaração do problema. Atualmente, vários produtos são utilizados para a descontaminação de próteses dentárias. Entretanto, nenhum deles apresenta eficácia microbicida sem causar danos indesejáveis a resina acrílica.

Objetivo. O objetivo desse estudo foi comparar a eficácia do plasma de baixa temperatura (PBT) sobre o biofilme de *Candida albicans* como uma alternativa para descontaminação de próteses dentárias frente aos métodos utilizados atualmente.

Materiais e Métodos. Discos de resina acrílica termoativada foram cultivados com biofilme de *C. albicans* e divididos em quatro grupos (n=21) que receberam os respectivos tratamentos: hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% em imersão por 5 min, peróxido alcalino (PA) por 15 min, plasma de baixa temperatura (PBT) aplicação por 2 min e o grupo controle (C) que não recebeu nenhum tratamento. A eficácia de cada tratamento foi determinada pelo número de unidades formadoras de colônias (UFC), por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise confocal. Os resultados de UFC foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Resultados. Os grupos NaOCl a 0,5% e PBT apresentaram uma redução significativa do biofilme, sendo que o NaOCl apresentou maior eficácia que o PBT no seu efeito antimicrobiano. O tratamento com PA não revelou diferença estatística em relação ao grupo controle. Na microscopia confocal o grupo NaOCl apresentou maior quantidade de células mortas, seguido pelo grupo PBT. Os grupos PA e C mostraram maior sobrevivência de *C. albicans*. Nas imagens de MEV foi possível observar uma alteração na estrutura morfológica das células de *C. albicans* no biofilme tratado com PBT.

Conclusão. O PBT e NaOCl demonstraram efeito antimicrobiano sobre biofilme de *C. albicans* aderido em resina acrílica para base de prótese dentária. Embora o tratamento com NaOCl tenha apresentado efeito antimicrobiano mais significativo, o PBT apresenta-se como um método não tóxico, não poluente e não deletério de desinfecção de próteses dentárias.

Palavras-chave: candidíase bucal, dentaduras completas, desinfecção, prótese dentária.

ABSTRACT

Statement of the problem. Currently, several products are used for the decontamination of dental prostheses. However, none of them shows microbicidal efficacy without causing undesirable damage on the acrylic resin.

Objective. The objective of this study was to compare the efficacy of low temperature plasma (PBT) on the biofilm of *C. albicans* as an alternative for decontamination of dentures compared to the methods currently used.

Materials and Methods. Heat-polymerized acrylic resin discs were cultured with *C. albicans* biofilm and divided into four groups (n = 21) receiving the following treatments: sodium hypochlorite (NaOCl) 0.5% immersion for 5 min, alkaline peroxide (PA) for 15 min, low temperature plasma (PBT) for 2 min and control group (C) that received no treatment. The efficacy of each treatment was determined by the number of colony forming unit (CFU), by scanning electron microscopy (SEM) and confocal analysis. The results of CFU were analyzed by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test ($p < 0.05$). In confocal microscopy, the NaOCl group had a higher number of dead cells, followed by the PBT group. The groups PA and C showed higher survival of *C. albicans*. In the MEV images it was possible to observe a change in the morphological structure of *C. albicans* cells in the PBT treated biofilm.

Results. The 0.5% NaOCl and PBT groups showed a significant biofilm reduction, and NaOCl exceeded PBT in its antimicrobial effect. The BP treatment did not show statistical difference in relation to the control group.

Conclusion. PBT and NaOCl demonstrated antimicrobial effect on *C. albicans* biofilm adhered in acrylic resin for denture base. Although NaOCl treatment had a more significant antimicrobial effect, PBT is a non-toxic, non-polluting and non-deleterious method of disinfecting dental prostheses.

Keywords: oral candidiasis, complete dentures, disinfection, dental prosthesis.

INTRODUÇÃO

O biofilme presente na superfície da prótese total é um dos fatores etiológicos da estomatite protética, uma doença crônica e multifatorial que tende a comprometer a qualidade de vida dos pacientes desdentados.¹ Nesse sentido, diversos microrganismos colonizam o biofilme oral, tornando-o patogênico² e prejudicial para a mucosa oral e saúde geral do paciente, levando a infecções locais ou sistêmicas que podem apresentar complicações.³ Dentre os microrganismos frequentemente encontrados no biofilme oral, a *C. albicans* é um fungo amplamente estudado diante de sua capacidade de penetrar em camadas celulares epiteliais e endoteliais de diferentes nichos no corpo humano.⁴

Aproximadamente 60 a 75% dos portadores de próteses dentárias apresentam alguma estomatite causada por biofilme de *C. albicans*, podendo ser chamada também de estomatite por dentadura, estomatite por *C. albicans* ou candidíase atrófica crônica.⁵ O papel da *C. albicans* na patogênese da estomatite protética tem sido bem investigado, e múltiplas cepas foram encontradas povoando o biofilme das próteses e tecidos orais.⁶ Nesse sentido, a superfície das próteses em contato com a mucosa é a principal área de armazenamento dos biofilmes contendo colônias do fungo.⁷

Embora a limpeza da prótese inicialmente tenha sido preconizada por princípios estéticos, os benefícios à saúde bucal tornaram-se evidentes.⁸ Atualmente, sabe-se que é necessário um controle efetivo do biofilme através de uma higienização adequada da prótese pois a aderência de microrganismos e resíduos é favorecida por superfícies irregulares e rugosas^{9,10} que reduzem a atividade dos agentes de limpeza.¹¹ Diante da necessidade de manutenção e limpeza da prótese, além da remoção mecânica foram desenvolvidos agentes químicos para auxiliar os pacientes

nessa higienização. Porém, os testes de eficácia desses produtos são complexos e os resultados relatados são variados pois, frequentemente, dependem das condições experimentais.¹²

Nesse sentido, não há na literatura um consenso de qual agente químico é o mais adequado para higienização de próteses totais visto que estudos clínicos demonstram resultados variados.^{8,13} Apesar disso, o que se espera do produto ideal para a higienização das próteses é que seja de fácil manuseio; efetivo na remoção dos depósitos orgânicos, inorgânicos e manchas; bactericida e fungicida; não tóxico ao paciente; não deletério aos materiais constituintes do aparelho e de baixo custo.^{8,14}

Considerando alternativas para a higienização das próteses, o plasma de baixa temperatura (PBT) tem mostrado resultados promissores no que se refere à inativação de *C. albicans*^{15,16,17} e outros microrganismos^{18,19} em biofilme e estado planctônico. De uma maneira simplificada, o plasma é o quarto estado da matéria gerado através da ionização de um gás e resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, radiação ultravioleta, íons, elétrons e moléculas neutras e excitadas.^{20,21} Enquanto agentes antimicrobianos altamente carregados e quimicamente reativos não são capazes de penetrar no biofilme através da matriz extracelular,²² pequenas moléculas geradas pelo plasma podem atravessar livremente essa barreira por meio de canais com diferentes diâmetros.²³ As espécies reativas e radiação ultravioleta geradas pelo plasma são capazes de causar dano e/ou morte celular através de desidratação; lise da membrana celular²⁴ e danos severos ao DNA, lipídeos e proteínas.^{25,26} Além disso, a diversidade de agentes reativos gerados pelo plasma dificulta o desenvolvimento de resistência microbiana ao tratamento.²⁷ Portanto, a utilização do PBT parece ser uma alternativa interessante devido a sua eficácia

microbicida²⁸, e seu uso como método para higienização de próteses dentárias deve ser avaliado.

Assim, o objetivo desse estudo foi comparar o efeito antimicrobiano do PBT sobre o biofilme de *C. albicans* aderido a resina acrílica utilizada para confecção de prótese dentária, com as soluções químicas hipoclorito de sódio e peróxido alcalino, mais utilizadas atualmente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho experimental

Discos de resina acrílica termopolimerizável (Artigos Odontológicos Classico Ltda, Campo Limpo Paulista, São Paulo, Brasil) foram inoculados com biofilme constituído por *C. albicans* e divididos em 4 grupos (n=21) de acordo com o tratamento realizado nas amostras com biofilme: Grupo C – nenhum tratamento foi realizado no biofilme; Grupo NaOCl – o biofilme foi imerso em hipoclorito de sódio a 0,5% (Vic Pharma Indústria e Comércio Ltda, Taquaritinga, São Paulo, Brasil); Grupo PA – o biofilme foi imerso em solução de peróxido alcalino (Corega tabs, Block Drug Company, Inc., Jersey City, New Jersey, USA); e Grupo PBT – o biofilme foi submetido à aplicação de plasma de baixa temperatura (Kinpen, INP, Greifswald, Alemanha). Para o tratamento no grupo NaOCl, as amostras ficaram imersas na solução por 5 minutos enquanto no grupo PA as amostras permaneceram imersas na solução contendo uma pastilha efervescente por 15 minutos, de acordo com a recomendação do fabricante. No grupo PBT, o plasma foi gerado com gás argônio sob pressão atmosférica e aplicado sobre o biofilme a uma distância de 3 mm durante 1 minuto, as amostras foram lavadas com solução salina tamponada com

fosfato (PBS) e submetidas a uma nova aplicação de plasma por mais 1 minuto. Após cada tratamento, as amostras foram lavadas cuidadosamente com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Confecção dos espécimes

Foram confeccionados 84 discos de resina acrílica termopolimerizável (Artigos Odontológicos Classico Ltda, Campos Limpo Paulista, São Paulo, Brasil), cor rosa médio, medindo 10 mm x 5 mm, manipulada de acordo com as instruções do fabricante. A fabricação dos discos foi padronizada através de matriz metálica para inclusão em mufla, contendo orifícios circulares na dimensão estabelecida para cada disco. Após a confecção, os discos de resina foram submetidos ao polimento em politriz utilizando lixas nas granulações 600, 800 e 1200 respectivamente, por um tempo de 10 minutos em cada lixa, para padronização da rugosidade. Após o polimento, os espécimes foram imersos em água destilada por 10 dias para eliminação de monômero residual.²⁹

Preparo do inóculo

Para a cultura do biofilme foi utilizado cepa de *C. albicans* (ATCC SC5314) obtidas junto à *American Type Culture Collection* e mantidas a - 80° C. As cepas foram semeadas em placas de Petri (TPP Techno Plastic Products AG, Suíça) contendo Ágar Saboraud Dextrose (SDA) e incubadas a 37° C por 48 horas. Para preparo do inóculo, a cultura foi transferida para 10 mL de Ynb (Base de Levedura - YNB com 100 mM de glicose) e incubada a 37° C por 18 horas. As células da cultura foram coletadas, lavadas duas vezes com 10 mL de solução salina tamponada com

fosfato (PBS - PO₄³⁻ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos a 21° C, e re-suspendidas em 10 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (RPMI-1640, Sigma-Aldrich Co., EUA) estéril. As densidades ópticas das suspensões foram padronizadas na concentração de 1x10⁷ células/mL.^{17,30} A determinação da concentração das soluções foi realizada utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

Adesão e cultivo do biofilme

Os discos de resina confeccionados foram esterilizados em micro-ondas imersos em água ultrapura por 3 minutos a 650 W.¹⁷ Para o preparo do biofilme, os espécimes de resina acrílica foram posicionados nos poços da placa de cultura e cada poço foi preenchido com 1 mL da suspensão de *C. albicans* padronizada e 1 mL de meio RPMI fresco. Os espécimes permaneceram em um agitador orbital (75 rpm) por 90 minutos a 37° C para a fase de adesão.⁶³ Após esse período, as células não aderentes foram removidas através de duas lavagens cuidadosas com 2 mL de PBS. Em seguida, 2 mL de meio RPMI foram adicionados a cada amostra para incubação por 24 horas a 37° C no agitador orbital. Após esse período, foi removido 1 mL do meio RPMI e adicionado 1 mL de meio fresco passando por novo ciclo de incubação de 24 horas a 37° C no agitador orbital. No final das 48 horas de incubação,^{31,32} foi observado visualmente a formação de um biofilme maduro na superfície de cada disco, que foram transferidos para um novo poço e lavados com 2 mL de PBS para os tratamentos propostos.

Análises das amostras

Para a quantificação das unidades formadoras de colônia viáveis (UFC/mL), o biofilme foi removido da superfície dos discos de resina utilizando uma haste flexível com ponta de algodão esterilizado, que foi posteriormente transferido para um tubo de centrífuga contendo 1 mL de PBS. Após agitação, foi realizada a diluição seriada para determinar o número de UFC / mL do microrganismo após 24 horas de incubação a 37 ° C. Após esse período, o UFC/mL foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $ufc/mL = \text{número de colônias} \times 10^n/q$. Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas. O número de UFC/ml foi submetida à análise estatística pelo teste ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, considerando $p < 0,05$.

Para a análise de microscopia confocal a laser, o biofilme foi corado usando o kit Live / Dead BacLight Viability (Invitrogen-Molecular Probes, EUA) para revelar a proporção de células vivas ou ativas (verde fluorescente) e células mortas ou inativas (vermelho fluorescente)⁴². O corante vivo / morto foi preparado diluindo 1,5 mL de componente de coloração A (SYTO 9) e 1,5 mL de componente de coloração B (iodeto de propídio) em 1,0 mL PBS (Invitrogen, EUA). Cada amostra foi coberta com 1 mL da mistura de reagentes e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente protegida da exposição à luz. Foi obtida uma série de imagens na secção z utilizando um microscópio confocal Leica TCS SP5 II (Leica, Alemanha) com lentes de imersão em água Leica HCX APO L 40x / 0,8 W U-V-I (Leica, Alemanha). Cinco campos ópticos representativos foram examinados para cada amostra para análise quantitativa.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), os discos contendo biofilme foram fixados com paraformaldeído a 4% por 1 hora e desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 85% e 100%) por 5 minutos em cada solução. Após a desidratação, as amostras foram mantidas em um dissecador por

24 horas antes do recobrimento com ouro. As imagens foram capturadas utilizando o SEM Hitachi S-3500N (Hitachi High Technologies América, EUA) com distância de trabalho de 8 mm e 10–15 kV.

Resultados

Os resultados quanto as UFC/ml são apresentados na tabela 1. De acordo com o teste ANOVA, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$); e o teste de Tukey mostrou que o grupo tratado com NaOCl apresentou maior eficácia na descontaminação do biofilme, mostrando uma redução significativa de \log_{10} UFC / mL, seguido pelo grupo PBT. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa em \log_{10} UFC / mL nas amostras controle e PA ($p = 0,28$).

TABELA 1 - Tratamento do Biofilme de *C. albicans* em resina

Grupo	Log ₁₀ UFC/ml (DP)	Média	Intervalo de confiança 95% Limites superior e inferior
Controle (n=21)	5,79 ^a	(0,41)	5,47 - 6,11
PA (n=21)	5,49 ^a	(0,20)	5,34 - 5,65
PBT (n=21)	4,00 ^b	(0,51)	3,60 - 4,39
NaOCl (n=21)	0,00 ^c	(0,00)	0,00 - 0,00

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. (teste de Tukey; $p < 0,05$)

Utilizamos o método Confocal (Fig. 1) para avaliar as células mortas/vivas de cada biofilme. Essa análise permite avaliar com clareza que as células das amostras tratadas com NaOCl apresentaram maior quantidade de células mortas quando comparadas aos demais grupos. Conforme exibido pelas imagens, foram observados poucas células vivas no grupo PBT e maior sobrevivência de *C. albicans* no grupo PA e Controle.

Como mostrado na figura 2, os biofilmes tratados com PBT apresentaram alteração na morfologia dos microrganismos / biofilme em comparação aos demais. Micrografias SEM (Fig. 2) revelaram perfuração da parede celular e membrana de *C. albicans* após tratamento com PBT. Como consequência, as células do biofilmes tratados com plasma pareciam achatadas, demonstrando danos à arquitetura do biofilme.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo apoiam a rejeição da hipótese nula quanto ao efeito antimicrobiano do NaOCl a 0,5% e PBT sobre o biofilme de *C. albicans*. NaOCl e PBT apresentaram maior efeito antimicrobiano, enquanto PA não revelou diferença estatística em relação ao grupo controle.

O intuito de incluir o PBT como uma das alternativas para descontaminação, foi avaliar a sua eficácia no controle do biofilme de *C. albicans* quando comparado aos agentes químicos mais utilizados atualmente,¹³ uma vez que já foi avaliado o seu uso no tratamento físico de bactérias, parasitas, fungos, esporos e vírus mostrou eficácia microbicida.³³

A presente investigação demonstrou que o tratamento com jato de PBT é adequado para reduzir substancialmente o biofilme de *C. albicans* em resina acrílica termoativada. Uma redução considerável de aproximadamente 2 intervalos de log 10 foi observado. Estes resultados confirmam dados publicados anteriormente sobre a eficácia de jatos de plasma frio para matar e remover microrganismos planctônicos ou aderentes^{34,35} e, especificamente, em *C. albicans*.^{36,37} Por ser ativado por elétrons, o plasma tem o potencial de matar microrganismos causando mudanças morfológicas quebrando ou rompendo a parede celular, sem causar danos ao redor dos tecidos.^{38,39} Como pode ser observado na Figura 2, houve o rompimento da parede celular após o tratamento com PBT. Esse rompimento pode ocorrer pois partículas carregadas geradas pelo plasma podem levar à lise da membrana quando a força eletrostática supera a resistência à tração da membrana,²¹ esse rompimento também foi observado em outro estudo.¹⁷

No entanto, nessa pesquisa, o efeito microbicida do PBT não apresentou resultado tão efetivo como NaOCl, que já tem demonstrado superioridade em relação a outros agentes químicos.^{40,41} A literatura aponta estudos com NaOCl em diferentes concentrações, sendo que a maioria utiliza 1% e 0,5%, que são eficazes contra microrganismos e biofilmes de prótese dentária.^{42,43} Mas, mesmo apresentando maior eficácia do que o PBT, existem algumas desvantagens a serem consideradas. A recomendação para uso do NaOCl nessas concentrações é de que a imersão da prótese não exceda o tempo de 10 min para não causar danos a mesma¹³ pois o NaOCl é uma substância oxidante e corrosiva. Isso impede que o NaOCl seja utilizado na descontaminação de próteses que contenham componentes metálicos, pois podem alterar seriamente sua forma e a resistência mecânica,⁴⁴ causados pelo ataque dos íons cloreto a essas superfícies metálicas. Além disso, a

literatura relata que seu uso também pode promover um aumento da rugosidade superficial da resina acrílica^{13,45} favorecendo a retenção tanto de microrganismos quanto de material orgânico.⁴⁶ Outro fator envolvido nas propriedades mecânicas é o monômero de metacrilato de metila residual na resina acrílica polimerizada, que possui efeito plastificante. Plastificantes de resina acrílica são lixiviados quando estão em contato com soluções contendo cloro⁴⁷, o que pode levar a degradação da resina acrílica a longo prazo. Por esse motivo, os espécimes deste estudo foram imersos em água destilada para eliminar os monômeros residuais.⁴⁸

Nesse sentido, é possível considerar que após o tratamento com PBT, as propriedades mecânicas da resina acrílica termoativada, como força flexural e módulo de elasticidade parecem permanecer estáveis.⁴⁹ Outra propriedade importante que pode ser alterada com o uso contínuo do NaOCl é o clareamento da cor da resina acrílica. Porta et. al,⁴³ em seu estudo clínico, não comprovou alteração de cor no tratamento com NaOCl 0,5%, mas outros estudos relatam esse efeito, principalmente no uso a longo prazo.^{42,50} Mudanças de cor em resinas acrílicas podem alterar fatores extrínsecos e intrínsecos, como solubilidade, absorção de água, rugosidade superficial e degradação química.⁵¹ Estrela et, al.⁵² mostraram em seu estudo, que o hipoclorito de sódio quando usado em baixas concentrações (0,5-1%), apresenta aceitável biocompatibilidade. Porém, para a maioria dos autores, o NaOCl apresenta toxicidade, risco de enfisema, potencial alergênico, é cáustico e possui gosto e cheiro desagradáveis.^{53,54} Nesse aspecto, o plasma se destaca pela ausência de odor desagradável, não promove riscos à saúde e não deixa resíduos na natureza. Outro fator importante é sua biocompatibilidade com os tecidos de suporte^{17,45}, estando de acordo com os requisitos de um agente de desinfecção ideal.^{8,13} Além disso, o tratamento com plasma de argônio/oxigênio parece ser uma

técnica promissora para melhorar a molhabilidade da superfície de resina acrílica sem degradar as propriedades físicas do material e, portanto, reduzir significativamente a aderência inicial de *C. albicans*.⁴⁹

Usar apenas técnicas baseadas em cultura para determinar efeitos antimicrobianos traz algumas desvantagens. Bactérias podem existir em um estado viável mas não cultivável.⁵⁵ Portanto, utilizamos o método Confocal para avaliar as células mortas/vivas de cada biofilme. Esse método mostrou mais diferenças entre os tipos de tratamento e foi possível observar com clareza o grande número de células vivas na imagem do tratado com PA, como mostra a Figura 1. Apesar de alguns estudos mostrarem a eficiência de comprimidos efervescentes na remoção de biofilme e manchas,^{56,57} os resultados dessa pesquisa estão de acordo com outros trabalhos^{58,59} que mostraram que as pastilhas efervescentes de peróxido alcalino não apresentaram eficácia na descontaminação do biofilme de *C. albicans*. Estudos provam que sua capacidade microbicida pode estar relacionada com o tempo de imersão, sendo mais efetivo por períodos prolongados.^{60,61} A solução de peróxido alcalino, assim como o NaOCl também pode alterar as propriedades da resina. A temperatura da água mais elevada usada para preparar as soluções é um fator crítico, resultando no branqueamento da resina acrílica.⁶² Outra pesquisa descobriu que a absorção de água nas superfícies de acrílico foi causada por solução de peróxido alcalino quente, que resultou em branqueamento de superfície irreversível quando os espécimes foram deixados para secar.⁶³ Ainda, em relação aos efeitos colaterais, trabalhos mostram que, higienizadores em pó, quando em contato com a mucosa ou ingeridos acidentalmente, devido à sua constituição química, podem causar sérias complicações e queimaduras no trato digestivo, edema local, inflamação e descamação da mucosa.⁶⁴

Embora o estudo tenha a limitação de ter sido realizado *in vitro* e com biofilme isolado de *C. albicans*, o PBT mostrou ser boa alternativa para descontaminação de prótese dentária, quando comparado aos agentes químicos convencionais. Destacando-se além do efeito microbicida, pelo tempo de aplicação, ausência de odor e gosto desagradáveis, biocompatibilidade^{17,45} com os tecidos orais e ausência de efeito residual. Assim, estudos futuros podem contribuir reforçando sua ação microbicida sobre o biofilme misto e na avaliação de seus efeitos físicos como alteração de cor das resinas acrílicas para base de próteses dentárias, especialmente para avaliar o custo de uma possível viabilização de um equipamento de PBT para descontaminação de próteses dentárias.

CONCLUSÃO

O uso do PBT como método de higienização reduziu significativamente o biofilme de *C. albicans*, não alcançando os resultados do tratamento com NaOCl. O PA não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. No entanto, o PBT mostrou-se uma alternativa interessante na desinfecção de próteses dentárias.

REFERÊNCIAS

1. Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, et al: Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:419-424
2. Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil.* 2005 Jul;32(7):518-25)
3. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. *J Dent.* 1998 May;26(4):299-304.
4. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10:359–83
5. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology.* 2005 September;22(3):168-76.
6. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, et al: Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:377-383)
7. 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 Mar- Apr;12(2):153-9
8. Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers: review of the literature. *Gerodontology.* 1985 Oct;1(5):202-6.
9. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(2):86-94.
10. Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract.* 2000 Feb 15;1(2):28-41.
11. Jagger DC, Al-Akham L, Harrison A, Rees JS. The effectiveness of seven denture cleansers on tea stain removal from PMMA acrylic resin. *Int J Prosthodont.* 2002 Nov- Dec;15(6):549-52
12. Council on Dental Materials, Instruments, and Equipment. Denture cleansers. *J Am Dent Assoc.* 1983 Jan;106(1):77-9
13. Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Am Dent Assoc.* 2011; 142 Suppl 1:1S-20S
14. Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979 Dec;42(6):619-23
15. Koban I, Matthes R, Hubner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Kramer A, Kocher T. treatment of *Candida albicans* biofilms with low- temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New Journal of Physics.* 2010;12:073039.

16. Yamazaki H, Ohshima T, Tsubota Y, Yamaguchi H, Jayawardena JA, Nishimura Y. Microbicidal activities of low frequency atmospheric pressure plasma jets on oral pathogens. *Dent Mater J.* 2011;30(3):384-91.
17. Delben JA, Zago CE, Tyhovych N, Duarte S, Vergani CE. Effect of atmospheric-pressure cold plasma on pathogenic oral biofilms and in vitro reconstituted oral epithelium. *Plos One.* 2016;25:1-18
18. Joaquin J, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Brelles-Marino G. Is gas discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiology.* 2009;155:724–32.
19. Koban I, Holtfreter B, Hubner N-O, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, Weltmann K-D, Welk A, Kramer A, Kocher T. Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro – proof of principle experiment. *J Clin Periodontol* 2011;38:956–65
20. Conrads H, Schmidt M. Plasma generation and plasma source. *Plasma Sources Sci Technol.* 2000;9:441–54
21. De Geyter N, Morent R. Nonthermal plasma sterilization of living and nonliving surfaces. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012;14:255-74.
22. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711–45.
23. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Am Soc Microbiol.* 2005;49:2467–73.
24. Traba C, Liang JF. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling.* 2011;27(7):763-72.
25. Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Trans Plasma Sci.* 1996; 24:1188-91.
26. Gaunt LF, Beggs CB, Georghiou GE. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE Trans Plasma Sci.* 2006;34:1257–69.
27. Alkawareek MY, Algwari QT, Gorman SP, Graham WG, O'Connell D, Gilmore BF. Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):381-4.
28. Sladek, R. E. J. & Stoffels, E. (2005) Deactivation of *Escherichia coli* by the plasma needle. *Journal of Physics D: Applied Physics* 38, 1716–1721.
29. Altieri KT. Efetividade de duas soluções desinfetantes e da irradiação por microondas na desinfecção de próteses totais contaminadas com *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). 2011. 157f. Dissertação (Mestrado em Prótese) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Araraquara, 2011.
30. Pereira CA., Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011;26:341-48
31. Thein ZW, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of oral Biology.* 2006;51:672-80.

32. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Oral Biol.* 2007;52:761-7.
33. Davenport JC, Wilson HJ, Spence D. The compatibility of soft lining materials and denture cleansers. *Br Dent J.* 1986 Jul 5;161(1):13-7.).
34. Lee, K., Paek, K. H., Ju, W. T. & Lee, Y. (2006). Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *J Microbiol* 44, 269–275.
35. Hong, Y. F., Kang, J. G., Lee, H. Y., Uhm, H. S., Moon, E. & Park, Y. H. (2009). Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Lett Appl Microbiol* 48, 33–37
36. Fricke K, Koban I, Jablonowski L, Schröder K, Kramer A, Weltmann T, Kocher T. Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms. *Plos One.* 2012;7(8):e42529
37. Weltmann KD, Kindel E, Brandenburg R, Meyer C, Bussiahn R, et al. (2009) Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation. *Contrib Plasma Phys* 49: 631–640
38. McCombs GB, Darby ML. New discoveries and directions for medical, dental and dental hygiene research: low temperature atmospheric pressure plasma *Int J Dent Hygiene.*2010;8:10–15
39. Laroussi M, Richardson JP, Dobbs FC. Effects of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology. *Appl Phys Letter* 2002; 81: 772–774
40. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, et al: Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont* 2008;17:627-633
41. Orsi IA, Junior AG, Villabona CA, Fernandes FH, Ito IY. Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerised acrylic resin. *Gerodontology* 2011;28:253-257
42. Andrade IM, Andrade KM, Pisani MX, et al: Trial of an experimental castor oil solution for cleaning dentures. *Braz Dent J* 2014;25:43-47
43. de Sousa Porta SR, de Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Del Bel Cury AA. Evaluation of sodium hypochlorite as a denture cleanser: a clinical study. *Gerodontology* 2015;32: 260-266
44. Keyf F, Gungor T. Comparison of effects of bleach and cleansing tablet on reflectance and surface changes of a dental alloy used for removable partial dentures. *J Biomater Appl* 2003;18:5-14.
45. Badaró M, Salles M, Arruda C, Oliveira V, Souza R, Paranhos H, Silva-Lovato C. In vitro analysis of surface roughness of acrylic resin exposed to the combine hygiene method of brushing and immersion in *ricinus communis* and sodium hypochlorite: *J. Prosthodont.*. 2017; 26:516-521
46. Verran J, Boyd RD: The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: a review. *Biofouling* 2001;17:59-71
47. Lima EM, Moura JS, Del Bel Cury AA, Garcia RC, Cury JA. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. *J Oral Rehabil* 2006;33:356-362
48. American Dental Association. Revised American Dental Association Specification no 12 for denture base polymers. *JADA* 1975;90:451-458
49. Hong PAN, Guomin WANG, Jie PAN, Guopin YE, Ke SUN, Jue ZHANG and Jing WANG. Cold plasma-induced surface modification of heat-polymerized acrylic

- resin and prevention of early adherence of *Candida albicans*. *Dent Mater J* 2015; 34(4): 529–536
50. Davi LR, Peracini A, Ribeiro NQ, Soares RB, Silva CH, Paranhos HF, et al. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in NaOCl solution. *Gerodontology* 2010;27:297-302
 51. Hong G, Murata H, Li Y, Sada- mori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stabil- ity of three types of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent* 2009; 101: 205–13
 52. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Souza-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.* 14(1):58-62, 2003.
 53. Cheung GS, Stock CJ. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. *Int Endod J.* 26(6):334-343, 1993.
 54. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 29(9):562-564, 2003.
 55. G. Bogosian and E. V. Bourneuf, “A matter of bacterial life and death,” *EMBO Reports*, vol. 2, no. 9, pp. 770–774, 2001
 56. Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. *J Prosthet Dent* 1984;52:158-163
 57. Catão, CDS, Ramos INC, Silva Neto JM, Duarte SMO, Batista AUD, Dias AHM. Eficiência de substâncias químicas na remoção de biofilme em próteses totais. *Rev Odontol UNESP.* 2007; 36(1): 53-60
 58. Andrade IM, Cruz PC, Silva CH, Souza RF, Paranhos HF, Candido RC, Marin JM, Souza-Gugelmin MC. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and mutans streptococci in denture biofilm. *Gerodontology.* 2011 Dec;28(4):264-70
 59. Silva FC, et al. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and ef- fects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont* 2008; 17: 627–633
 60. Hutchins, D. W.; Parker, W. A. A clinical evaluation of the ability of denture cleaning solutions to remove dental plaque from prosthetic devices. N. Y. State D. J., New York, v. 39, p. 363-7, June-July. 1973
 61. Budtz-Jørgensen, E.; Kelstrup, J. Enzyme as denture cleansers. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v. 85, n.3, p.209-15, March, 1977
 62. Robinson JG, McCabe JF, Storer R. Denture bases: the effects of various treatments on clarity, strength and structure. *J Dent* 1987;15:159-165)
 63. Devlin H, Kaushik P. The effect of water absorption on acrylic surface properties. *J Prosthodont* 2005;14:233- 238.
 64. Abramson A.L.; Eason R.L., Pryor W.H.Jr., Messer E.J. Corrosive injury of the oral cavity and esophagus caused by some denture cleanser powders. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, St. Louis, v. 83, n. 6, p. 714-9, nov./dec. 1974.

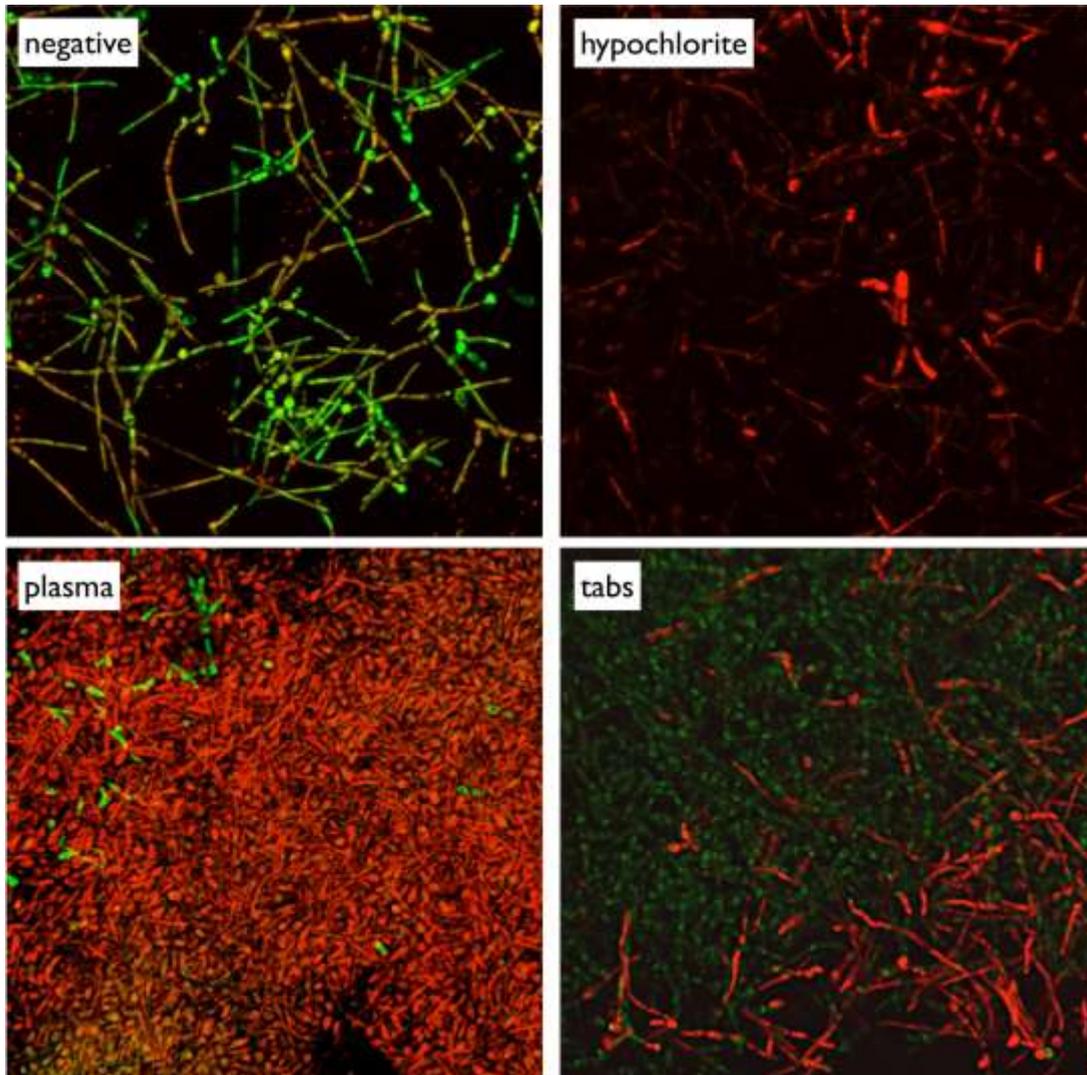


FIGURA 1 - Análise Confocal do biofilme após tratamento para cada grupo com aumento de 4x. Biofilme corado com kit Live / Dead BacLight Viability. Células vivas em células fluorescentes verdes e mortas em vermelho.

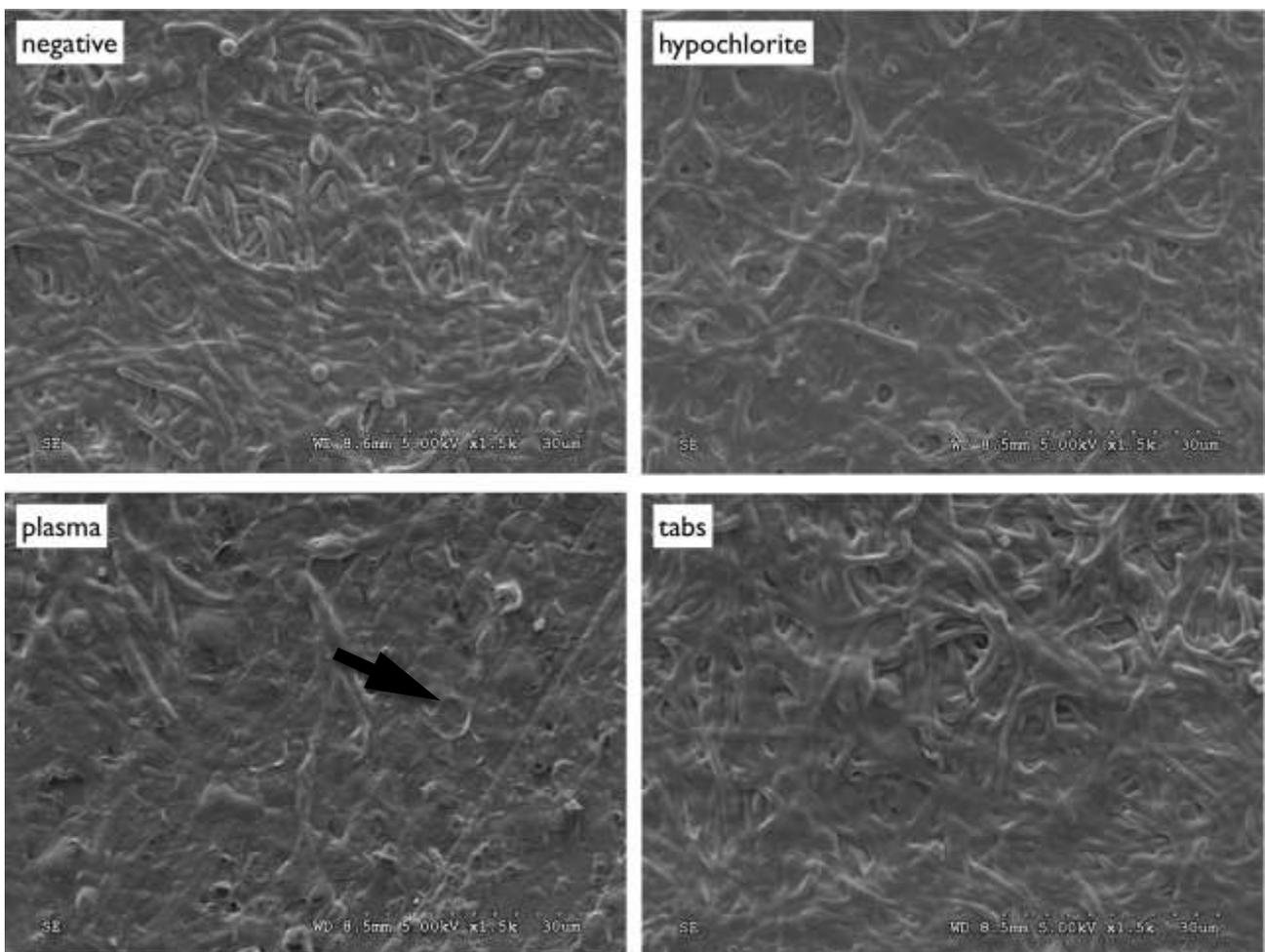


FIGURA 2 - Fotomicrografias de espécimes representativas do biofilme de *C. albicans* após o tratamento de cada grupo. A seta mostra o rompimento da célula de *C. albicans* no biofilme tratado com PBT.

