



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**CITOTOXICIDADE RESIDUAL E ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MOLECULAR  
DO POLIMETILMETACRILATO APÓS PROTOCOLOS DE HIGIENIZAÇÃO PARA  
PRÓTESES TOTAIS**

Florianópolis

2023

# **CITOTOXICIDADE RESIDUAL E ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MOLECULAR DO POLIMETILMETACRILATO APÓS PROTOCOLOS DE HIGIENIZAÇÃO PARA PRÓTESES TOTAIS**

Dissertação submetida ao programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Malheiros Badaró

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ariádne Cristiane Cabral da Cruz

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Soto, Artur Ferronato

Citotoxicidade residual e alteração da composição molecular do polimetilmetacrilato após protocolos de higienização para próteses totais / Artur Ferronato Soto ; orientador, Maurício Malheiros Badaró, coorientador, Ariádne Cristiane Cabral da Cruz, 2023.

52 p.

Dissertação de mestrado (pós-graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Pós-graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Prótese. 3. Desinfecção. 4. Citotoxicidade.  
I. Ferronato Soto, Artur II. Malheiros Badaró, Maurício III Cabral da Cruz, Ariádne Cristiane. Universidade Federal de Santa Catarina. Pós Graduação em Odontologia.

Artur Ferronato Soto

**CITOTOXICIDADE RESIDUAL E ALTERAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MOLECULAR  
DO POLIMETILMETACRILATO APÓS PROTOCOLOS DE HIGIENIZAÇÃO PARA  
PRÓTESES TOTAIS**

Esta dissertação de mestrado foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em  
Odontologia - Clínica Odontológica.

Florianópolis, 1º de agosto de 2023

---

Coordenador do Programa de Pós Graduação

**Banca examinadora**

---

Prof. Dr. Maurício Malheiros Badaró  
Orientador

---

Profª. Drª. Cristiane Machado Mengatto  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profª. Drª. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis

2023

*Dedico este trabalho a minha avó Dona Cecília que este ano completou 90 anos.*

*Meu exemplo de dedicação, força e bondade.*

## AGRADECIMENTOS

Viver por si só com saúde durante esses anos já é uma benção, agradeço a **Deus**, que independente de sua forma ou religião, ama a todos incondicionalmente, e me permitiu concluir mais essa etapa.

À minha querida família, em especial minha **mãe**, meu maior exemplo de amor, trabalho, dedicação e respeito. Por você me estimular a estudar e apoiar sempre, fazendo de tudo, conseguimos chegar até aqui. Representa minhas raízes, as quais que me fazem ter muito orgulho, saber para onde voltar, e que o melhor lugar do mundo é o nosso lar. Obrigado pela vida, por me dar asas e me ensinar a voar. És a minha maior inspiração.

Obrigado **pai**, sempre presente em todas as etapas da minha vida me apoiando, tenho eterna gratidão. Obrigado, por nunca ter soltado minha mão. Tenho em ti meu exemplo de força e resiliência e tenho muito orgulho da tua história e nossa família chilena. Minha admiração por vocês atravessa uma cordilheira.

A minha amada avó, **Dona Cecília**, sua bondade e carinho são imensuráveis. És o maior exemplo para todos que te cercam. Que bênção viver contigo essa conquista.

Por mais que os anos passem, meu amor pela senhora jamais irá envelhecer.

Na odontologia e no meu trabalho, se hoje estou certo que me encontrei no meio acadêmico devo a uma pessoa. Inicialmente, agradeço à prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Cristiane Mengatto**, que desde meu primeiro ano da graduação acreditou em mim, me instigou e me abriu as portas para ciência. Fizeste parte de momentos marcantes da minha trajetória. Que prazer e honra poder dividir mais este momento contigo.

Ao prof. Dr. **Maurício Badaró**, meu orientador e grande amigo. Tenho por ti enorme admiração. És um exemplo para mim, tua trajetória me inspira cada dia a seguir meu próprio caminho. Obrigado por ter me orientado nesses anos, com leveza, tranquilidade e antes de tudo parceria.

A minha Coorientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Ariádne Cruz**, que abriu as portas e para que essa pesquisa fosse conduzida. Agradeço principalmente pela gentileza e cordialidade com que me orientou. Obrigado por confiar no meu trabalho.

Obrigado a prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Mabel** por aceitar o convite e ser tão generosa conosco.

Aos meus queridos amigos, **Mateus Muller** e **Débora**, com quem posso contar e confiar por aqui. Foram meu amparo e alicerce durante todos esses anos.

Aos amigos que fiz aqui na pós-graduação, gratidão pela parceria e pela amizade! Durante o primeiro ano conheci **Rangel**, **Laís**, **Akira** e **Adriana**, que me estimularam e muito me ensinaram sobre os caminhos da pós-graduação. Obrigado por tudo, quero levar a amizade de vocês por muitos anos.

No segundo ano do mestrado me aproximei de outros colegas que também foram fundamentais no processo. Obrigado aos meus amigos, **Duda** e **Murilo** pelo companheirismo e irmandade. As colegas **Alessandra** e **Zuila**, parceiras de pós, também tenho enorme carinho por vocês; e a **Alexandra**, que foi minha colega de iniciação com quem tive o privilégio de cruzar o caminho novamente.

A todos alunos da graduação, futuros colegas, com quem pude ensinar, mas muito mais aprender. Em especial, ao **Giovani**, **Nathália**, **Ana Beatriz**, **Isabela**, e **Rafaela** foram grandes amigos, obrigado meus queridos, certamente chegarão muito longe!

Fiz amigos de todas áreas do conhecimento muito me ajudaram para execução deste trabalho, os quais sou muito grato, como adorável **Amanda**, grandes engenheiras como **Viviane** e **Aline**, que em especial, me ajudou de uma forma impecável. E aos biólogos, farmacêuticos, veterinários e todos queridos membros do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), obrigado por tudo!

Ao corpo docente da UFSC com excelência no ensino, me orientaram de alguma forma até chegar aqui. Aos professores da odontologia, tenho muito carinho e gratidão à brilhante prof<sup>a</sup>. Dra. **Analúcia**, que com o nível de exigência nas estrelas, muito aprendi e me inspiro muito, a prof<sup>a</sup>. Dra. **Thaís G.**, pela competência, e ao prof Dr. **Mezzomo** pelo pioneirismo compartilhados ao grupo. As nossas queridas prof<sup>as</sup>.

Dra. **Juliana** e prof<sup>a</sup>. Dra. **Thais D.**, obrigado pela parceria e cumplicidade. Aos professores da biologia prof<sup>a</sup>. Dra. **Gislaine**, prof. Dr. **Ricardo** por abrirem as portas dos seus laboratórios e serem nossos parceiros.

E obrigado, ao **Batista**, a **Rita**, a **Cris**, a **Ro** e a todos demais servidores que cuidam com muito zelo da nossa universidade.

Muito obrigado!

*A vida esconde nos lugares mais simples sua grande beleza, que revela qual o significado de porquê persistimos em continuar vivendo.*

**Pablo Neruda**

## RESUMO

A aplicabilidade da associação de métodos (escovação e imersão química) na desinfecção é fundamental para higienização de próteses totais. Visando evitar danos biológicos e aos materiais, o controle da citotoxicidade residual se torna imprescindível para a segurança do usuário e longevidade da prótese. O objetivo foi identificar protocolos menos citotóxicos e mais inertes à composição molecular da resina acrílica (PMMA) para desinfecção de próteses totais, variando a ordem da intervenção mecânica e química, concentração do hipoclorito de sódio (NaOCl), e a conduta final de imersão em água. Catorze grupos (n=9) foram formados pela concentração do NaOCl (0,5%; 0,25%; 0,1%) e ordem de intervenção: C (controle, sem intervenção); E (escovação); I (imersão isolada/ concentração); E+I (escovação e imersão/ concentração); I+E (imersão/ concentração e escovação); E+I+A [escovação, imersão/ concentração e *overnight* (8 horas) em água]. Queratinócitos HaCat foram semeados em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/mL na face rugosa de corpos de prova de PMMA. A citotoxicidade em foi analisada após 1, 3 e 7 dias pelo teste MTT e por epifluorescência. A composição molecular do PMMA foi avaliada por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR). A comparação intergrupo usou ANOVA one-way/Tukey e a intragrupo ANOVA two-way/Sidak, ( $p \leq 0,05$ ). No dia 1, a ordem de intervenção foi indiferente ( $p \leq 0,05$ ), diferindo do controle. No dia 3 houve maior citotoxicidade em todos os protocolos, exceto E+I+A, igual a C ( $p \geq 0,05$ ). Após 7 dias, E+I+A obtiveram maiores porcentagens de viabilidade celular que C para todas as concentrações ( $p \leq 0,05$ ). Alterações morfológicas (lise, fragmentação de membrana e condensação nuclear) foram vistas nos protocolos mais citotóxicos. Em E+I+A houve agregados celulares similares ao C e ausência de alteração do PMMA em todos os tempos analisados.

Concluiu-se que a associação de métodos, independente da concentração do NaOCl, com período *overnight* em água por 8 horas, é menos citotóxica e mais inerte ao PMMA.

**Palavras chave:** Resina Acrílica, Prótese Total, Desinfecção, Queratinócitos, Viabilidade Celular.

## ABSTRACT

The applicability of the association of methods (brushing and chemical immersion) in disinfection is fundamental for cleaning complete dentures. In order to avoid biological and material damage, control residual cytotoxicity becomes essential for user safety and longevity of the prosthesis. The aim was to identify less cytotoxic and more inert acrylic resin (PMMA) protocols for cleaning complete dentures, varying the order of mechanical and chemical intervention, concentration of sodium hypochlorite (NaOCl), and the final conduct of immersion in water. Fourteen groups (n=9) were formed by NaOCl concentration (0.5%; 0.25%; 0.1%) and order of intervention: C (control, no intervention); B (brushing); I (immersion/concentration); B+I (brushing and immersion/concentration); I+B (immersion/concentration and brushing); B+I+W [brushing, immersion/concentration and overnight (8 hours) in water]. Cytotoxicity in HaCat keratinocytes was observed after 1, 3 and 7 days by the MTT test and by epifluorescence. The molecular composition of PMMA was evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The intergroup comparison used one-way ANOVA/Tukey and the intragroup two-way ANOVA/Sidak,  $p \leq .05$ . On day 1, the intervention order was indifferent ( $p \leq .05$ ), differing from the control. On day 3, there was greater cytotoxicity in all protocols, except B+I+W, equal to C ( $p \geq .05$ ). After 7 days, B+I+W obtained values greater than C for all concentrations ( $p \leq .05$ ). Morphological changes (lysis, membrane fragmentation and nuclear condensation) were seen in the most cytotoxic protocols. In B+I+W there were cell aggregates similar to C and absence of PMMA alteration (FTIR).

It is concluded that the combination of methods, regardless of NaOCl concentration, with an overnight period in water for 8 hours, is less cytotoxic and more inert to PMMA.

**Key-words:** Acrylic Resins, Denture, Disinfection, Keratinocytes, Cell Viability

## LISTA DE ABREVIACÖES

ERP	<i>estomatite relacionada a prótese</i>
NaOCI	<i>hipoclorito de sódio</i>
LSS	<i>lauril sulfato de sódio</i>
PMMA	<i>polimetilmetacrilato de metila</i>
MTT	<i>sal tetrazólio</i>
FTIR	<i>espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier</i>
ANOVA	<i>análise de variância</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Porcentagem de viabilidade celular.....	41
<b>Figura 2</b> – Morfologia celular por epifluorescência.....	42
<b>Figura 3</b> – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)....	43

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	19
3. ARTIGO.....	20
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

## 1 INTRODUÇÃO

A estomatite relacionada à prótese (ERP) é um processo inflamatório que envolve principalmente a mucosa palatina quando recoberta por próteses totais deficientemente higienizadas (YARBOROUGH, et al. 2016). A etiologia é multifatorial, acompanhada da redução das defesas imunológicas, as doenças sistêmicas e o tabagismo que contribuem para o desenvolvimento da condição (SHULMAN, RIVERA-HIDALGO e BEACH, 2005). Além disso, contribuem para o agravamento dessa condição o uso contínuo de próteses no período noturno associada a uma higiene bucal precária com acúmulo de biofilme na prótese. (MILWARD, KATECHIA e MORGAN, 2013).

A maioria das doenças causadas pelo gênero *Candida* estão associadas com a formação de biofilme no hospedeiro. Biofilmes são comunidades microbianas associadas a uma superfície, embebidas em uma matriz extracelular de polissacarídeos, garantindo estrutura e proteção das células constituintes (O'TOOLE, KAPLAN e KOLTER, 2000). A população bacteriana diversificada e a comunidade microbiana se desenvolve em uma comunidade madura complexa, incluindo doenças oportunistas (MENGATTO, et al. 2015).

A prevalência de ERP é bastante expressiva, acomete amplamente os usuários de próteses, variando de 10% a 75% (GENDREAU e LOEWY, 2011). O fator etiológico é multifatorial, devido presença de patógenos oportunistas de diferentes espécies do gênero *Candida* no biofilme da prótese (BADARÓ, et al. 2020). As próteses totais quando precariamente higienizadas podem atuar como reservatórios de patógenos, responsáveis por contribuir para o agravamento de doenças sistêmicas, como

endocardite bacteriana, pneumonia aspirativa, infecção gastrointestinal e doenças pulmonares (COULTHWAITE e VERRAN, 2007).

Diferentes técnicas são necessárias para inibir a adesão de espécies fúngicas, estas incluem o uso de agentes antifúngicos locais e sistêmicos (sua eficiência é prejudicada pelo surgimento de espécies de *Candida* resistentes a drogas), sendo imprescindível corrigir desajustes da prótese, imergi-las em soluções desinfetantes antifúngicos (BAJUNAID, 2022). O controle das espécies do gênero *Candida* é difícil e complexo, sendo que a higiene oral deficiente permite maior adesão de detritos na superfície da prótese, tornando-a uma potencial fonte de contaminação (GLEIZNYS, ZDANA VIČIENĖ e ŽILINSKAS, 2015).

A resina acrílica constituída de polimetilmetacrilato (PMMA) é um dos materiais poliméricos amplamente utilizados não só na odontologia, mas também na constituição de diversos biomateriais (ZAFAR, 2020). O PMMA de próteses possui irregularidades de superfície e microporosidades que facilitam a aderência e colonização de fungos para a formação de biofilmes, bem como a permanência residual de soluções desinfetantes (SESMA, et al. 2005). Usualmente, a resina acrílica termopolimerizável é o material de escolha para confecção de próteses totais, sendo de fácil manuseio, adequada resistência, estabilidade aceitável no meio bucal, baixa solubilidade, biocompatibilidade, estética favorável e custo acessível (NEJATIAN, PEZESHKI e SYED, 2019). A superfície rugosa do material com porosidades serve de reservatório facilitando o acúmulo de matéria orgânica, bem como a adesão de microrganismos (FIGUERÔA, et al. 2018). Além disso, outras desvantagens inerentes ao material também facilitam a adesão microbiana, tais como: sorção e absorção altas, contração e expansão do material, alta energia livre de superfície, baixo ângulo de contato com conseqüente alto valor de molhabilidade superficial (SAHM, et al.

2022). Dessa maneira, uma rotina regular e disciplinada de higiene é necessária para as próteses e mucosa oral, visando a manutenção da saúde e prevenção da ERP, conscientizado sobre a importância da higienização (MILWARD, KATECHIA e MORGAN, 2013).

A remoção de biofilme pode ser realizada por meio de diferentes formas de higiene, incluindo métodos mecânicos (com escova dental) ou químicos (com soluções desinfetantes de imersão), sendo que a associação entre ambos é a forma mais eficiente (PARANHOS, et al. 2007). A escovação é o método mecânico mais simples e efetivo, indicado também para o palato e tecidos de suporte. (KABAWAT, et al. 2014) entretanto, limitações relacionadas com idade avançada dos indivíduos, como deficiência visual e limitações motoras que contribuem para má higiene das próteses embora não tenha sido encontrada associação com seus fatores de risco (MOREL, et al. 2019). Nesses casos, a escovação isoladamente torna-se ineficiente para o controle do biofilme em próteses totais (BABA, et al. 2000). Além disso, a ação abrasiva da escova e do dentífrício utilizados na limpeza pode resultar em desgaste superficial do material (PASIGA, et al. 2018) e formação de nichos que facilitam adesão do biofilme microbiano. Em relação ao método químico, será considerada não apenas a toxicidade do desinfetante residual, mas também toxicidade resultante da absorção da solução pelo material durante o protocolo de desinfecção, que posteriormente entrará em contato com a mucosa bucal do paciente (RYU, et al. 2013; SOTO et al., 2019).

A biocompatibilidade ou ausência de citotoxicidade são definidas pela capacidade do material de desempenhar a função própria sem induzir efeitos indesejáveis locais ou sistêmicos (ATA e YAVUZYILMAZ, 2009). Como as resinas acrílicas são amplamente utilizadas na prática clínica, podendo apresentar sorção dos

agentes desinfetantes, apresentar a biocompatibilidade é essencial. Considerando que a maioria dos estudos relatam respostas de toxicidade, estudos adicionais com diferentes métodos de avaliação são necessários para o desenvolvimento de desinfetantes mais biocompatíveis (GOIATO, et al. 2015; SOTO, et al. 2019).

Na desinfecção de próteses totais, a solução com maior eficácia, é o hipoclorito de sódio (NaOCl), que atua diretamente na matriz orgânica dos microrganismos, possui propriedades fungicidas e bactericidas, e pode eliminar biofilme (BADARÓ, et al. 2017; SOTO, et al. 2019). O NaOCl promove a perda da integridade da membrana celular e liberação de conteúdo citoplasmático dos microrganismos (VALENTINI-MIOSO, et al. 2019). Estudos têm mostrado a eficácia do NaOCl na remoção do biofilme de próteses dentais em diferentes concentrações como 0,1% (ARRUDA, et al. 2017). As concentrações a 0,5% e 0,25% também mostraram eficácia antimicrobiana contra leveduras e bactérias (BADARÓ, et al. 2017; SALLES, et al. 2015). Além disso, a literatura mostrou que concentrações elevadas, ou seja, 1%, não devem ser usadas, por causarem alterações de cor e diminuição da resistência à flexão da resina acrílica (PISANI, et al. 2012). O NaOCl apresenta efeitos indesejados, incluindo quebra da integridade de tecidos moles, gosto ruim, cheiro desagradável, efeito corrosivo em metais, aumento da rugosidade nas superfícies da prótese e alterações de cor quando usada em concentrações iguais ou superiores a 0,5% e com tempo de imersão superior a 20 minutos (PARANHOS, et al. 2013). Os efeitos tóxicos dos agentes desinfetantes incluem irritação da mucosa oral, assim como dano celular (PROCÓPIO, et al. 2018). Segundo a “*American Dental Association – ADA*” a imersão das próteses totais em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 10 minutos uma vez por semana, associada à limpeza mecânica 3 vezes ao dia com escova e creme dental

e a recomendação de o paciente dormir sem a prótese, reduz efetivamente a viabilidade microbiana (FELTON, et al. 2011).

A toxicidade de um desinfetante residual é influenciada por fatores como biodisponibilidade após a absorção, a rota pela qual o desinfetante residual entra no material e a toxicidade relativa de cada solução (MASSETI, et al. 2018). Análises com concentrações inferiores a 0,5% de NaOCl devem ser realizadas, dado o grande potencial antimicrobiano (BADARÓ, et al. 2017). Assim, futuras investigações devem avaliar os efeitos antimicrobianos e citotóxicos desta solução quando impregnada na resina acrílica em concentrações inferiores às recomendadas para imersão das próteses, desde que não apresente efeitos deletérios a mucosa do paciente (PROCÓPIO, et al. 2018).

Apesar da associação entre métodos ser preconizada, ainda não existem evidências de qual a melhor sequência de higienização nos protocolos indicados na prática clínica diária, bem como a concentração do NaOCl que seja segura, mantendo a menor citotoxicidade residual. Além disso, a solução de NaOCl em altas concentrações degrada os componentes da resina acrílica, causando alteração na composição molecular do material. São necessários estudos empregando a espectroscopia para avaliar o efeito residual do NaOCl e a degradação do PMMA, a fim de facilitar o entendimento do processo de interação entre o material que constitui as próteses totais e a principal solução desinfetante utilizada para o controle microbiano diário.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo desse estudo foi definir a sequência de realização da associação de métodos para higienização de próteses totais, variando a ordem da instituição da intervenção mecânica com sabão líquido neutro, e intervenção química, com a imersão em diferentes concentração do hipoclorito de sódio (NaOCl 0,5%; 0,25%; 0,1%), e a conduta ao ao término do protocolo higienização com a imersão em água por 8 horas (*overnight*), segundo as variáveis de resposta para a efetividade antimicrobiana e o controle da citotoxicidade residual.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1) Avaliar e comparar com o controle celular a citotoxicidade residual pela viabilidade celular mensurada por meio da atividade mitocondrial do teste colorimétrico (MTT) - análise quantitativa, após os protocolos de higienização.

2) Avaliar e comparar com o controle celular a citotoxicidade residual por meio da morfologia celular por epifluorescência (EF) - análise qualitativa, após os protocolos de higienização.

3) Avaliar a composição química das amostras por meio de espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR), antes e após realização dos protocolos de higienização.

### 3 ARTIGO

#### **Citotoxicidade residual e alteração da composição molecular do polimetilmetacrilato após protocolos de higienização para próteses totais**

##### **RESUMO**

O objetivo foi identificar protocolos menos citotóxicos e mais inertes ao polimetilmetacrilato (PMMA) para desinfecção de próteses totais, variando a ordem da intervenção mecânica e química, concentração do hipoclorito de sódio (NaOCl), e a conduta final de imersão em água. Catorze grupos (n=9) foram formados pela concentração do NaOCl (0,5%; 0,25%; 0,1%) e ordem de intervenção: C (controle, sem intervenção); E (escovação); I (imersão isolada/ concentração); E+I (escovação e imersão/ concentração); I+E (imersão/ concentração e escovação); E+I+A [escovação, imersão/ concentração e *overnight* (8 horas) em água]. A citotoxicidade em queratinócitos HaCat foi analisada após 1, 3 e 7 dias pelo teste MTT e por epifluorescência. A composição molecular do PMMA foi avaliada por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR). A comparação intergrupo usou ANOVA *one-way/post hoc* Tukey e a intragrupo ANOVA *two-way/post hoc* Sidak,  $p \leq 0.05$ . No dia 1, a ordem de intervenção foi indiferente ( $p \leq 0.05$ ), diferindo do controle. No dia 3 houve maior citotoxicidade em todos os protocolos, exceto EIA, igual a C ( $p \geq 0.05$ ). Após 7 dias, EIA obtiveram valores maiores que C para todas as concentrações ( $p \leq 0.05$ ). Alterações morfológicas (lise, fragmentação de membrana e condensação nuclear) foram vistas nos protocolos mais citotóxicos. Em E+I+A houve agregados celulares similares ao C e ausência de alteração do PMMA (FTIR). Conclui-se que a associação de métodos, independente da concentração do NaOCl, com período *overnight* em água por 8 horas, é menos citotóxico e mais inerte ao PMMA.

Key words: Complete Denture, Mouth Rehabilitation, Cytotoxicity, Disinfection.

## INTRODUÇÃO

O uso contínuo de próteses totais reduz o efeito da capacidade tampão da saliva (Emami, et al. 2014), dificulta o contato do fluxo salivar com a mucosa, inibe a oxigenação local e causa um declínio no pH do meio (Emami, et al. 2014; Singh, et al. 2014). A retenção de detritos orais e crescimento de patógenos oportunistas aumentam a prevalência de doenças inflamatórias, como a estomatite relacionada a prótese (ERP) (Emami, et al. 2014). Considerando a higienização protética, uma porcentagem considerável de pacientes referiu apenas uso de escova para higienização, com uso noturno das próteses (Muñoz, et al. 2023). A ERP possui relação com a precária higienização, uso contínuo das próteses, acúmulo de biofilme e colonização por *Candida* spp, acomete de 65% a 72% dos usuários de próteses totais. (Khan, et al. 2020; Singh et al. 2014, Gendreau, 2011). Em casos de imunossupressão, pode causar agravamento de doenças sistêmicas, (Singh, et al. 2014, Khan, et al. 2020) como pneumonia por aspiração, doença pulmonar obstrutiva crônica, (Przybyłowska, 2015) redução da pressão sistólica e arterial, e endocardite (Ribeiro, et al. 2022).

O controle dos microrganismos que colonizam as próteses totais e mucosa da cavidade bucal deve ser feito por protocolos de higienização, com relatos de remissão da ERP (Kabawat, et al. 2014; Badaró, et al. 2017, 2020). Em contrapartida, a citotoxicidade residual das soluções desinfetantes utilizadas para desinfecção química (imersão) causa irritação da mucosa, tecido cutâneo, olhos e vias respiratórias (Gagnaire, et al. 2002; Rideout, et al. 2005; Hawley, 2017) pode promover efeitos tóxicos como danos celulares ao epitélio (Soto, et al. 2019 A; Soto, et al. 2019 B). Os protocolos de higienização para próteses totais devem associar intervenções mecânicas (escovação) e químicas (desinfecção química por imersão) (Paranhos, et al. 2007). Contudo, não existe a indicação adequada da ordem de intervenção (mecânica e química) a ser instituída considerando a menor citotoxicidade residual do protocolo.

Tradicionalmente, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução desinfetante mais utilizada para desinfecção química de próteses totais. Contudo, pode causar injúria a mucosa dependendo da concentração, sensação de queimação, dor, vermelhidão, edema, bolhas ou mesmo necrose tecidual quando em altas concentrações (Slaughter, et al. 2019). Além de efeitos deletérios na cicatrização de feridas, decorrente da supressão do fluxo sanguíneo e toxicidade tecidual local. Ainda, concentrações elevadas do NaOCl promovem alterações nas propriedades físico-mecânica (Rocha, et al. 2021; Coelho, et al. 2023) superficiais dos materiais constituintes das próteses totais (Ribeiro, et al. 2019). Quando em concentrações reduzidas, como 0,25% e 0,1%, minimizam os efeitos adversos dos materiais (Badaró, et al. 2017; Arruda, et al. 2016; Arruda, et al. 2018) sem comprometimento da eficácia antimicrobiana (Badaró, et al. 2017; Arruda, et al. 2017; Arruda, et al. 2018; Salles, et al. 2015; Badaró, et al. 2021) o que viabiliza o uso das referidas concentrações nos protocolos de higienização para próteses totais. Em contrapartida, não é conhecido o potencial citotóxico dessas concentrações, sendo essa uma importante lacuna do conhecimento a ser respondida.

O NaOCl a 5,25% promove aumento da citotoxicidade em proporção direta ao tempo de exposição, causando efeitos citotóxicos e danos oxidativos ao DNA de fibroblastos gengivais humanos (Uğur, et al. 2018). A concentração de 0,0002% do NaOCl não apresenta citotoxicidade para queratinócitos e fibroblastos, e não compromete a migração celular durante a cicatrização (Ortega-Lopes, et al. 2022). O aumento do pH do NaOCl interfere na integridade da membrana, ocasionando uma inibição enzimática irreversível, além da capacidade de dissolver tecidos orgânicos (Estrela, et al. 2002). Ainda, a natureza das soluções desinfetantes afeta as propriedades do PMMA, inclusive com alteração da composição molecular, que promove alterações na resistência à flexão, módulo de elasticidade e dureza do material, ratificando que a seleção das soluções desinfetantes é crucial para longevidade das reabilitações (Alkaltham, et al. 2023). A literatura indica que a sorção de água pelo polimetilmetacrilato

(PMMA) ocorre em condições aceitáveis por até 7 dias de imersão contínua, havendo ainda biocompatibilidade do material (Akin, et al. 2013). Para próteses totais, o período *overnight* de imersão em água pode ser uma alternativa para amenizar a citotoxicidade do NaOCl e os efeitos adversos sobre os materiais constituintes das próteses. Apesar disso, não há estudos que avaliem a citotoxicidade relacionada a associação da água como parte integrante dos protocolos de higienização.

Dessa forma, a identificação do protocolo de higienização com maior biocompatibilidade e menor alterações moleculares a resina constituinte das bases das próteses totais é imprescindível para longevidade das reabilitações e saúde do usuário. O objetivo deste estudo foi definir o protocolo de higienização menos citotóxico e mais inertes ao PMMA, variando a ordem de sequência da associação de métodos (mecânico e químico), a concentração do hipoclorito de sódio (NaOCl 0,5%; 0,25%; 0,1%) e a associação com a imersão posterior em água destilada (*overnight*). A hipótese nula é a não diferença entre as ordens de realização dos métodos mecânicos e químicos de higienização. A hipótese 1 do estudo é a concentração do NaOCl sendo diretamente proporcional a citotoxicidade residual. A hipótese 2 do estudo é a redução do efeito citotóxico do NaOCl após a imersão *overnight* em água e na alteração molecular ao material.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Delineamento do estudo***

Estudo primário, experimental *in vitro*, duplo cego, em triplicata com três repetições com análise paralela de 14 grupos distintos: 01 controle e 13 experimentais, divididos em estratos segundo a ordem de uso do método mecânico e químico, concentração do NaOCl, e imersão *overnight* em água posterior realização dos protocolos de higienização. As variáveis de resposta desse estudo foram citotoxicidade residual e composição química do polimetilmetacrilato. Para

alcançar os desfechos propostos foram empregados os métodos de análise da viabilidade e morfologia celular com ensaio de (MTT e epifluorescência), e espectroscopia FTIR (composição residual molecular).

O tamanho amostral foi calculado pelo teste de ANOVA para medidas repetidas. No primeiro cálculo foi estimado o tamanho de efeito encontrado nas comparações de Atalay et al. (2022) e na descrição de Sordi et al. (2021) e calculado o tamanho amostral necessário para os parâmetros do presente estudo (tamanho de efeito estimado  $f=0,4669$ ; probabilidade de erro alfa: 5%,  $p < 0,05$ ; poder de teste: 80%; 13 grupos e 3 medidas repetidas), resultando em uma amostra total de 26 espécimes. Posteriormente, foi calculado o tamanho amostral necessário para identificar diferenças menores com tamanho de efeito pequeno ( $f=0,12$ ), visto que, no presente estudo, o número de grupos e medidas é maior do que o artigo de Atalay et al. (2022). Dessa forma, utilizando os mesmos parâmetros anteriores ( $f=0,12$ ;  $\alpha=0,05$ ; poder=0,80; 13 grupos e 3 medidas repetidas) foi necessária uma amostra total de 117 corpos de prova, ou seja, 9 corpos de prova em cada grupo (*software* GPower© versão 3.1.9.4).

### ***Confecção dos espécimes***

Espécimes retangulares (40 x 5 x 2 mm;  $n = 5$ ) foram confeccionados em resina acrílica termopolimerizável (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Matrizes metálicas foram incluídas em muflas convencionais, número 07 (OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com gesso pedra tipo III (Gesso Rio, Rio Claro, SP, Brasil) e silicone de condensação denso (Zetalabor, Zhermack, Badia Polesine, RO, Itália) para obtenção de moldes. A resina acrílica termopolimerizável foi manipulada de acordo com as recomendações do fabricante, acomodada nos moldes e prensada (Prensa Hidráulica–Protecni, Protecni Equipamentos Médicos, Araraquara, SP, Brasil) a 1250 Kgf por 30 minutos. A polimerização ocorreu pelo método convencional em banho de água (Panariello, et al. 2016) e o acabamento com broca de tungstênio tronco cônica Minicut® (American Burrs®, Palhoça,

SC, Brasil), seguida de escovas com diferentes granulações: fina, média e grossa (Scotch Brithe®, American Burrs®, Palhoça, SC, Brasil).

Para padronização da rugosidade de superfície dos espécimes foi utilizada lixa d'água de granulação 120 (Norton, Norton Saint-Gobain, Guarulhos, SP, Brasil) em politriz (Panambra Industrial e técnica S.A. - DP-10, São Paulo, SP, Brasil) e mensuração em rugosímetro Instrutherm RP-100 (Instrutherm, São Paulo, SP, Brasil). Três leituras de 5 “cutofs” de 0,8 µm foram realizadas na região central e distando 1 mm para ambos os lados, para cálculo da média final. Os espécimes foram padronizados com a rugosidade variando de 2,7 a 3,7 µm, simulando a superfície interna da prótese. Posteriormente, cada espécime retangular foi seccionado com discos de carborundum (Dentorium Products Inc.; Farmingdale, NY, Estados Unidos) montados em mandril (Microdont; São Paulo, SP, Brasil) e peça reta (INTRA 500, Kavo do Brasil Indústria e Comércio Ltda; Joinville, SC, Brasil), originando 8 novos espécimes quadrangulares (3 x 3 x 2 mm). Todas as amostras foram verificadas com paquímetro digital (Mister Comércio de Materiais de Construção, Três Rios, RJ, Brasil).

### ***Formação dos grupos e Protocolos de Higienização***

Catorze grupos (n=9) foram formados de acordo com a concentração do NaOCl (0,5%; 0,25%; 0,1%) e ordem de uso dos métodos de higienização: C (controle, sem intervenção); E (escovação manual isolada com sabão líquido neutro); I (imersão isolada/ concentração); E+I (escovação e imersão/ concentração); I+E (imersão/ concentração e escovação); E+I+A (escovação, imersão/ concentração e *overnight* de 8 horas em água).

Para o método mecânico foi realizada escovação manual, com escova dental (K' Dental Comércio de Materiais Odontológicos Ltda., Taboão da Serra, São Paulo, SP, Brasil) associada ao sabão líquido neutro (Beira Alta Cosméticos Ltda, Guarulhos, SP, Brasil). A escovação foi instituída simulando 3 meses (Feldmann et al., 2020) na vertente rugosa dos corpos de prova, com movimento padronizado (sentido único) por 2 segundos (Ramage, et al. 2012), totalizando

180 segundos. Ao final da escovação, os corpos de prova foram enxaguados em água destilada por 5 segundos. O método químico utilizou o NaOCl nas concentrações de 0,5%, 0,25% e 0,1% (Perfecta Farmácia de Manipulação Ltda., Florianópolis, SC, Brasil) para imersão por 20 minutos diário (Salles, et al. 2015; Arruda, et al. 2017; Badaró, et al. 2017; Arruda, et al. 2018; Badaró, et al. 2020). Em conformidade com os 3 meses simulados para escovação, o método químico foi instituído por 30 horas. Somente os grupos E+I+A realizaram imersão *overnight* em água destilada (8 horas), para simular o período noturno em que o usuário de prótese total dorme sem as próteses. O pH das soluções foi verificado em pHmetro (Kasvi Importação e Distribuição de Produtos para Laboratórios Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil).

Finalizados os protocolos de higienização para cada grupo, os corpos de prova foram acondicionados em envelopes próprios para esterilização e identificados por números. A esterilização por difusão do gás óxido de etileno promove a alquilação direta dos constituintes celulares, levando à desnaturação do DNA microbiano (França, et al. 2013; Mendes, et al. 2007). O método apresenta vantagens como eficácia em baixas temperaturas, alta penetração e compatibilidade com uma ampla gama de materiais (França, et al. 2013; Mendes, et al. 2007). A esterilização dos espécimes foi programada no 1º ciclo com pré-vácuo de 20 minutos a 55 °C, 180 minutos de esterilização, 120 minutos de hiperventilação, pressão de 50 kgf/cm<sup>2</sup> e vácuo de 50 kgf/cm<sup>2</sup>. Ao final, os ensaios foram realizados em condição de cegamento do operador e estatístico.

### ***Semeadura Celular***

As células da linhagem celular de queratinócitos humanos HaCaT (#T002000; AddexBio, San Diego, Califórnia; Laboratório de Migração Celular – LAMOC, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil) foram descongeladas em garrafas de cultivo contendo meio de cultura DMEM-alto teor de glicose (GIBCO, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Mass), suplementado com 10%

soro fetal bovino (GIBCO, Thermo Fisher Scientific Inc) e penicilina-estreptomicina a 1% (GIBCO, Thermo Fisher Scientific Inc). Em seguida, foi realizada incubação úmida (95% de umidade) e 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C (Soto, et al. 2019) por 3 dias.

Após atingir 80% de confluência, confirmada em microscópio de luz invertida (Axio Observer.Z1; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha), as células foram lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS; GIBCO, Thermo Fisher Scientific Inc) (Soto, et al. 2019). Em seguida, a passagem celular (tripsinização) é efetuada para desaderência das células por incubação em tripsina-EDTA a 0,1% (GIBCO, Thermo Fisher Scientific Inc), por 10 minutos (Soto, et al. 2019). Ao final, a padronização celular foi feita em densidade de  $1 \times 10^4$  células/mL em contador automático de células Countess (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA)

#### ***Citotoxicidade residual por MTT***

Em placa de 96 cavidades, com os corpos de prova distribuídos por grupo, 0,1 µL da solução de contagem padronizada em Countess foi pipetada na superfície rugosa das amostras e deixadas para aderência por 4 horas em repouso. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C em estufa de cultivo celular por 1, 3 e 7 dias.

O preparo do sal tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, Brasil) foi realizado de acordo com Kumar et al. (2018). A solução estoque de MTT a 5µg/mL foi diluída em meio de cultura DMEM alta glicose, na proporção de 10 µL de corante para 100 µL de meio DMEM a fim de obter a concentração de 1 µg/mL, para metabolização do sal pelas células. Após cada tempo de análise (1, 3 e 7 dias), as cavidades das placas previamente incubadas tiveram o sobrenadante aspirado e foram lavadas com PBS, para aplicação do MTT. As placas foram então incubadas a 37°C, por 4 horas para metabolização do MTT. Finalizada as 4 horas de metabolização do MTT, cada cavidade foi aspirada e recebeu 100 µL de Dimetilsulfóxido

(DMSO, Sigma-Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, Brasil), sob agitação por 5 minutos para liberação dos cristais metabolizados. Por fim, a conteúdo foi transferido para uma nova placa de 96 cavidades para leitura em espectrofotômetro SpectraMax® M5 (Molecular Devices, LLC, San José, CA, EUA), à 570 nm.

Para avaliação da citotoxicidade, considerando a viabilidade celular foi aplicada a norma ISO 10993-5 (2009) Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. O limite para considerar a ocorrência de biocompatibilidade é de 70% de viabilidade celular, valores menores serão considerados citotóxicos. É importante avaliar a citotoxicidade de biomateriais para descartar possíveis efeitos residuais devido à toxicidade do material (Khader, et al. 2022).

### ***Morfologia celular por fluorescência***

A microscopia de epifluorescência (análise qualitativa) foi usada para avaliar a presença de células viáveis aderidas a superfície dos corpos de prova. A análise da morfologia celular e integridade da membrana complementa os ensaios de viabilidade. Para análise qualitativa da morfologia celular, os experimentos foram realizados em conformidade as etapas anteriores até a padronização da densidade celular em  $1 \times 10^4$  células/mL. Após 1, 3 e 7 dias do crescimento e adesão das células sob as amostras (n=9, por grupo em triplicata), as cavidades receberam 200  $\mu$ L de corante Live/Dead® (Live/Dead® – Life Technologies of Brazil Com. Ind. Prod. Biotec. Ltda., Itapevi, SP, Brasil), manipulado de acordo com Ortega-Llamas et al. (2022). O conjunto foi mantido em temperatura ambiente, por 15 minutos em proteção da luz.

Posteriormente, as amostras foram colocadas em laminas individuais para análise em microscópio de fluorescência (Olympus BX, Olympus Co., Shinjuku, Tóquio, Japão) com filtro FS38HE (coloração verde) e objetiva de 60 $\times$  (software Zen Lite 2.3 – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Imagens da superfície de cada corpo de prova foram capturadas para análise da

morfologia celular no software AxioVision (versão AxioVision 4.8.2 – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) (Badaró, et al. 2021). Mudanças na morfologia geral foram descritas em caso de citotoxicidade, como vacuolização, descolamento, lise, diminuição do crescimento celular e integridade da membrana (Soto, et al. 2019).

### ***Composição molecular por FTIR***

Os efeitos dos protocolos de higienização na natureza química da resina acrílica termopolimerizável, composta pelo polímero polimetilmetacrilato de metila são analisados utilizando o espectrofotômetro FTIR (FTIRspectrophotometer-8400S, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) (Alkaltham, et al. 2023). As amostras, antes e após exposição aos protocolos de higienização de cada grupo, foram analisadas em FTIR. Para isso, os corpos de prova foram submetidos ao método de pressão entre lâminas pelo pó de brometo de potássio (KBr), usando prensa hidráulica. Posteriormente foram posicionadas em folha magnética para análise no FTIR, onde um feixe de luz infravermelho após incidir, foi transmitido através da amostra até o detector, que mensura o tamanho de onda para medição final da composição da amostra. O detector foi projetado para medir o sinal do interferograma que posteriormente foi digitalizado e enviado para o computador onde ocorreu a transformação de Fourier.

### ***Análises dos dados***

Após cálculo da normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e distribuição homogênea (teste de Levene), os dados foram analisados ( $\alpha=0,05$ ) quanto às comparações intra grupos com teste ANOVA (one-way) e o teste post hoc de Tukey. As comparações intergrupos utilizaram o teste ANOVA (one-way) e o teste post hoc de Sidak. O programa SPSS 21.0 (SPSS Inc.) foi utilizado considerando um intervalo de confiança de 95%. Análises descritivas foram aplicadas para as imagens de fluorescência. Os dados da FTIR foram processados pelo *software* OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

## RESULTADOS

### *Citotoxicidade celular por MTT*

Ao avaliar os tipos de protocolos de higienização independente das concentrações do NaOCl, quando houve associação com a imersão em água ocorreu a maior biocompatibilidade em todos os tempos de análise e em todas as concentrações analisadas. A escovação isolada (E) com sabão neutro obteve menor biocompatibilidade. Em relação a ordem de intervenção, os protocolos foram biocompatíveis, porém a imersão nas maiores concentrações do NaOCl (0,5% e 0,25%) antecedendo a escovação com sabão neutro com menor citotoxicidade. Independente da concentração do NaOCl, os protocolos de higienização referente a imersão isolada, escovação seguida de imersão e imersão seguida de escovação foram intermediários entre o protocolo de higienização associado a água e a escovação isolada com sabão neutro (Tabela 1).

Considerando as concentrações do NaOCl dentro do mesmo protocolo de higienização, as imersões isoladas (I) apresentaram a concentração de 0,25% como a mais favorável no dia 1. No dia 3, somente a concentração de 0,1% se manteve biocompatível. No dia 07, todas as concentrações se igualaram ao controle e promoveram biocompatibilidade. Para o protocolo de higienização (E+I), iniciado pela escovação seguida de imersão, não há diferença entre as concentrações de 0,1% e 0,25%. Para o protocolo de higienização (I+E), com a imersão prévia a escovação, as concentrações de 0,1% e 0,25% foram iguais em todos os tempos. No dia 07, todas as concentrações se igualaram e promoveram biocompatibilidade. Para os protocolos de higienização (E+I+A) associados a imersão *overnight* em água, todas as concentrações não causaram citotoxicidade, com viabilidade celular superior a 90% (Tabela 2).

Na análise longitudinal para os tempos 1, 3 e 7 dias, a viabilidade celular mais favorável ocorreu nos grupos associados com a imersão *overnight* em água, enquanto que a menor viabilidade celular foi atribuída à escovação isolada com sabão neutro. Os grupos I01, E+I01,

I025+E e todos os protocolos de higienização associados a imersão *overnight* em água se mantiveram iguais independente do tempo. Houve aumento da citotoxicidade nos grupos I05, I025, E+I05, E+I025, I05+E e I01+E, causando menores efeitos citotóxicos aos 7 dias, com aumento da viabilidade celular (Tabela 3).

### ***Morfologia celular por fluorescência***

Na avaliação qualitativa da morfologia celular, a escovação (E) apresentou em 1 dia, poucas células aderindo a superfície do PMMA, presença de espaços intercelulares e células isoladas em comparação ao controle. Após 3 e 7 dias, houve um aumento da quantidade células. Esse comportamento é semelhante nos grupos de imersões isoladas I05, I025 e I01.

Os protocolos de higienização E+I e I+E demonstraram poucas células aderidas quando comparadas ao grupo controle. Houve percepção de um indicativo inicial de citotoxicidade, caracterizado pelo aumento do tamanho nuclear, sugerindo condensação do material genético, em que a cromatina se condensa e fica próxima a membrana, a qual não é lesionada; características iniciais de apoptose. Ainda, é possível verificar prolongamentos com porções celulares chamadas de corpos apoptóticos, com retração da célula decorrente da perda de aderência da membrana celular, sendo indicativo processos degenerativos.. Ademais, há o aparecimento de estruturas redondas e escuras de diferentes tamanhos no citoplasma, sugestivas de fagossomos, vesículas formadas por processos de endocitose. Ao passar do sétimo dia, houve recuperação da viabilidade com menos danos a morfologia da célula. Para a concentração de 0,1% do NaOCl no protocolo de higienização E+I, houve maior viabilidade celular com justaposição e aderência das células em todos os tempos.

Para os protocolos de higienização associados com a imersão *overnight* em água (E+I+A) houve aumento de adesão celular superior ao grupo controle, caracterizado pela grande quantidade de células formando agregados em todos os tempos. Ademais, são observados

pontos fluorescentes no interior dos núcleos acompanhados de condensação nuclear, que ocorrem quando as células estão próximas da mitose (Figura 2).

### *Análise dos espectros por FTIR*

Uma vez que o PMMA é obtido pela polimerização do metilmetacrilato, ele apresenta um grupo éster no qual a carbonila (C=O) aparece ligada a outro oxigênio (heteroátomo) em uma cadeia carbônica (Figura 3A). A carbonila é observada em todos os espectros de FTIR como uma banda intensa em  $1723\text{ cm}^{-1}$ , enquanto deformações axiais da ligação  $-\text{OCH}_3$  são observadas em  $1190$  e  $1387\text{ cm}^{-1}$ . As bandas em  $1240$  e  $1144\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações de estiramento C–O–C, enquanto as em  $1270\text{ cm}^{-1}$  são oriundas da ligação C–O.

Quanto aos demais grupos alquila, as bandas em  $1387$  e  $750\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas às vibrações do grupo metil. A banda em  $987\text{ cm}^{-1}$  é característica do PMMA (Duan, et al. 2008), bem como as observadas na sua proximidade, em  $1064$  e em  $843\text{ cm}^{-1}$ , as quais se referem às vibrações angulares do grupo  $\text{CH}_2$ . As bandas em  $1438$  e em  $2994\text{ cm}^{-1}$  correspondem às vibrações das ligações C–H do grupo  $\text{CH}_3$ , já a em  $2951\text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionada às vibrações de alongamento da ligação C–H do grupo  $\text{CH}_2$ . A banda  $3430\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a vibrações axiais da ligação O–H associada a polímeros, todavia, também pode representar a água adsorvida na superfície do material, o que dificulta a atribuição da banda, representa o estiramento do grupo funcional metila.

Na busca por diferenciar os espectros, o único que mais se distingue se refere à amostra tratada apenas com escovação. O espectro do grupo E é o único com banda em  $1019\text{ cm}^{-1}$ , a qual também é atribuída a vibrações da ligação C–O. Ainda, essa amostra gerou a banda de maior intensidade em  $3430\text{ cm}^{-1}$ , seguida do grupo I05, indício de maior presença de ligações O–H. Os protocolos de higienização E+I+A independentes da concentração do NaOCl obtiveram os espectros mais próximos ao controle, sugerindo as menores alterações ao material.

## DISCUSSÃO

Esse estudo buscou indicar qual o protocolo de higienização promove maior viabilidade celular durante o uso no PMMA termopolimerizável, sendo capaz de proporcionar redução da citotoxicidade, identificar a concentração menos citotóxica do NaOCl e amenizar às alterações ao material. Dessa forma, a hipótese 1 do estudo foi aceita, uma vez que a concentração de 0,5% do NaOCl obteve as maiores citotoxicidades em relação as menores (0,25% e 0,1%). A hipótese 2 foi igualmente aceita, devido a redução do efeito citotóxico e das alterações moleculares superficiais do PMMA, após a imersão *overnight* em água. Por fim, a hipótese nula foi rejeitada, em decorrência das diferenças nas variáveis analisadas entre os protocolos de higienização instituídos.

Isoladamente, os métodos mecânicos ou químicos são insuficientes para desinfecção das próteses totais (Baba, et al. 2018). O protocolo de higienização, que combina ambos os métodos, é consolidado como o mais eficaz (Coulthwaite & Verran, 2007; Paranhos, et al., 2007; Felton, 2011; Baba, et al., 2018). A escovação com dentifício ou sabão líquido neutro é a indicação mais comum para limpeza das próteses totais, no entanto, exige destreza motora, que se torna limitada em muitos idosos (Coulthwaite & Verran, 2007). De forma complementar, a imersão em soluções químicas contribui para remoção do biofilme remanescente (Badaró, et al. 2017; Badaró, et al. 2020). Estudos na literatura demonstram a efetividade antimicrobiana dos protocolos de higienização, independente da ordem de realização dos métodos mecânico e químico (Salles, et al. 2015; Badaró, et al. 2017; Badaró, et al. 2020). Contudo, faltam esclarecimentos relacionados a citotoxicidade residual quanto a ordem de realização da escovação e imersão. O presente estudo é precursor em comprovar que independentemente da ordem de intervenção, os protocolos de higienização não promoveram citotoxicidade.

O sabão líquido neutro utilizado para escovação de próteses totais (Salles, et al. 2015; Arruda, et al. 2017; Badaró, et al. 2017; Arruda, et al. 2018; Badaró, et al. 2020), possui na composição o lauril sulfato de sódio (LSS), com excelente poder de detergência e formação de espuma (Park, et al. 2015). Em contrapartida, o LSS é altamente irritante à pele, induz a inflamação, sendo capaz de deixar a boca seca e causar estomatite aftosa recorrente (Jeong, et al. 2010; Park, et al. 2015). Transpondo para a prática clínica diária, o usuário de próteses totais utiliza o sabão líquido neutro não diluído, assim como realizado no presente estudo. Em consonância, mesmo em baixas concentrações, o LSS (0,005 e 0,0075%) induz em queratinócitos a condensação e segmentação das células, indicando apoptose e redução na viabilidade celular dependente ao tempo (Park, et al. 2015). Neste estudo, os maiores efeitos citotóxicos foram atribuídos ao método isolado de escovação com sabão líquido neutro, que pode ter ocorrido devido a resquícios do LSS. Em acréscimo, diante da toxicidade elevada atribuída ao composto, é indicado que a escovação não seja realizada de forma isolada, permitindo a remoção de resíduos remanescentes pelas etapas subsequentes de imersão.

Em associação à escovação com sabão líquido neutro, o NaOCl é o agente químico comumente utilizado para desinfecção de próteses totais por imersão (Salles, et al. 2015; Arruda, et al., 2017; Badaró, et al. 2017; Arruda, et al. 2018; Badaró, et al. 2020). O NaOCl apresenta algumas limitações relacionadas ao efeito citotóxico, afetando diretamente a viabilidade celular (Alkahtani, Alkahtany & Anil, 2014). Os efeitos citotóxicos decorrentes da imersão em soluções desinfetantes, podem ocorrer devido absorção pelo PMMA, com posterior liberação na saliva (Orsi, et al. 2011). Contudo, a verificação da citotoxicidade relacionada a concentração do NaOCl e o tempo de imersão carece de maiores abordagens. Há relatos na literatura, das concentrações de 0,25% e 0,1%, que mantiveram a eficácia antimicrobiana e amenizaram as alterações nas propriedades do PMMA, quando utilizadas em ciclo curto de imersão de 20 minutos (Badaró, et al. 2017; Arruda, et al. 2018; Coelho, et al. 2023). Nesse

sentido, este estudo é original em avaliar a citotoxicidade do PMMA em cultura celular após imersão em NaOCl a 0,25% e 0,1%, que demonstraram ser mais seguros para uso diário do que o NaOCl a 0,5%.

Estudos semelhantes avaliando quantitativamente a citotoxicidade do NaOCl em queratinócitos HaCaT pelo ensaio de MTT, mostraram que no 1º dia de contato, as concentrações menores ou iguais 0,1% não promoveram citotoxicidade sendo biocompatíveis, enquanto as concentrações de 0,5% promoveram reduções expressivas na viabilidade celular (Kardaras, et al. 2023). Consoante ao presente trabalho, a citotoxicidade do NaOCl foi considerada dependente da concentração (Kardaras, et al. 2023). Para análise qualitativa da morfologia celular no 1º dia, as células produziram mudanças na forma e na confluência celular, apresentaram formato arredondado, com aumento espaços intercelulares em comparação com as células controle (Kardaras, et al. 2023). Portanto o 1º dia é considerado o período que melhor reproduz as condições de uso do paciente, momento em o efeito residual do o NaOCl passa a ser pronunciado aos tecidos epiteliais.

A análise qualitativa da viabilidade celular nos protocolos de higienização com associação de métodos foi observada a presença de aglomerados celulares alongados, após 3 dias de cultivo e aglomerados redondos bem definidos, em maior quantidade, após 7 dias. Esses achados estão em conformidade com Soto-Quintero (2022), que relataram após 3 dias de cultivo que as células aderiram à superfície, com padrão linear alongado (estriado), o qual foi colonizado pelas células até o aumento do recobrimento da superfície, após 7 dias. Os pontos fluorescentes foram visualizados circundando o núcleo celular de ambos os estudos no tempo final, o que sugere remissão da citotoxicidade, com plena recuperação dos processos de divisão celular. No presente trabalho, no dia 1 devido a aderência estarem nos estágios iniciais, as alterações foram menos perceptíveis. No dia 3 mostrou os menores valores de viabilidade celular, sugerindo maior tempo de contato com a superfície desinfetada e conseqüentemente os

efeitos residuais foram mais pronunciados. Por fim, no dia 7 houve a recuperação celular devido atenuação dos efeitos citotóxicos decorrentes da remoção dos resíduos dos agentes desinfetantes, indicando que o tempo é necessário para recuperar a viabilidade celular e tornar a superfície biocompatível.

Os protocolos de higienização que indicam o armazenamento *overnight* da prótese total em água preconizam a remoção no período noturno (Badaró, et al. 2017; Badaró, et al. 2020). Há relatos de correlação entre o tempo de uso das próteses e a presença de lesões orais, como ERP (Ercalik-Yalcinkaya & Özcan, 2015). O armazenamento em água após protocolos de higienização reduz a liberação residual das soluções desinfetantes no meio bucal (Orsi, et al. 2011). Portanto, é reforçada a recomendação da imersão em água em período *overnight*, após a instituição dos protocolos de higienização, corroborando com os achados desse estudo que evidenciaram menor citotoxicidade e alteração molecular do PMMA termopolimerizável.

O PMMA quando imerso em água por 24 horas não sofre alterações nas propriedades (Oliveira, et al. 2010). No presente estudo, foi utilizado um tempo inferior, de 8 horas, simulando o período que o paciente dorme sem as próteses, reforçando a segurança do método quanto a preservação do material. Em se tratando da solução líquida desinfetante, o NaOCl atua como plastificante ao PMMA, alterando sua estrutura química (Durkan, et al. 2013). O NaOCl interage com as cadeias poliméricas do PMMA e influencia a integridade da superfície das bases de próteses (Durkan, et al. 2013). A avaliação dos espectros em FTIR identificou a cadeia polimérica do PMMA nas bandas dos grupos carbonila e metila em  $1722-1144\text{ cm}^{-1}$ , sendo essa a característica intrínseca do material atribuída às vibrações de alongamento C-O-C (Alkaltham, et al. 2023). Nesse estudo, foram identificadas bandas com picos de absorção em  $3430\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuído ao alongamento do grupo -OH, que segundo Duan et al. (2008) são característicos de umidade fisicamente absorvida. Esse achado sugere que houve a incorporação desse grupamento pela exposição do PMMA ao sabão líquido neutro, quando

realizada a escovação isolada (E). Ainda, houve aparente diferença entre os espectros da linha de base (Controle) e os espectros referentes aos protocolos de higienização que associaram os métodos mecânicos e químicos, com menor alteração no grupo E+I+A, sugerindo ser o protocolo mais inerte.

Por fim, a limitação desse estudo foi a não realização de tempos maiores relacionando os protocolos de higienização com a citotoxicidade e definição complementar em caráter quantitativo a alteração molecular do material. Estudos futuros sugerem a realização dos testes em outros tipos de resina acrílica, bem como a realização de análises clínicas e antimicrobianas. Por essa razão, estudos futuros complementares devem ser realizados, de forma a permitir a aplicabilidade clínica dos achados laboratoriais.

## CONCLUSÃO

1. Os protocolos de higienização com imersão *overnight* posterior em água apresentam menor citotoxicidade, independente das concentrações do NaOCl analisadas. Os protocolos de higienização com imersão *overnight* em água foram os mais inertes sobre a composição molecular do PMMA.
2. A associação dos métodos mecânico e químico independente da ordem de instituição demonstram não causar citotoxicidade residual.
3. Escovação isolada com sabão líquido neutro é o protocolo mais citotóxico dentre os avaliados.

## TABELAS

**Tabela 1** – Comparação da viabilidade celular (%) entre grupos na mesma concentração em protocolos diferentes.

Viabilidade Celular (%) Média ± DP				
Grupo	1° DIA	3° DIA	7° DIA	
<b>(A)</b>	<b>C</b>	100,0 ± 0,0 <sup>ac</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	<b>E</b>	70,0 ± 22,4 <sup>a</sup>	46,3 ± 12,4 <sup>a</sup>	79,8 ± 34,9 <sup>a</sup>
	<b>I05</b>	84,2 ± 32,7 <sup>ab</sup>	67,3 ± 17,3 <sup>ab</sup>	98,6 ± 16,7 <sup>a</sup>
	<b>E+I05</b>	87,8 ± 19,6 <sup>ab</sup>	58,2 ± 16,8 <sup>ab</sup>	97,2 ± 25,9 <sup>a</sup>
	<b>I05+E</b>	107,3 ± 18,0 <sup>bc</sup>	76,2 ± 24,1 <sup>bc</sup>	103,9 ± 30,9 <sup>a</sup>
	<b>E+I05+A</b>	131,5 ± 32,9 <sup>c</sup>	92,4 ± 15,1 <sup>cd</sup>	118,0 ± 33,6 <sup>a</sup>
<b>Teste F</b>	7,336	14,573	1,917	
<b>p-valor</b>	<0,001	<0,001	0,109	
<b>(B)</b>	<b>C</b>	100,0 ± 0,0 <sup>ac</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	<b>E</b>	70,0 ± 22,4 <sup>a</sup>	46,3 ± 12,4 <sup>a</sup>	79,8 ± 34,9 <sup>a</sup>
	<b>I025</b>	110,4 ± 37,8 <sup>bc</sup>	62,8 ± 17,6 <sup>ab</sup>	115,6 ± 32,1 <sup>b</sup>
	<b>E+I025</b>	76,0 ± 16,0 <sup>ab</sup>	73,0 ± 14,7 <sup>b</sup>	100,9 ± 13,8 <sup>ab</sup>
	<b>I025+E</b>	92,0 ± 35,5 <sup>abc</sup>	66,2 ± 20,1 <sup>ab</sup>	93,7 ± 26,5 <sup>ab</sup>
	<b>E+I025+A</b>	116,9 ± 37,2 <sup>c</sup>	125,0 ± 26,6 <sup>c</sup>	120,2 ± 26,9 <sup>b</sup>
<b>Teste F</b>	3,873	24,665	3,016	
<b>p-valor</b>	0,005	<0,001	0,019	
<b>(C)</b>	<b>C</b>	100,0 ± 0,0 <sup>ac</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	<b>E</b>	70,0 ± 22,4 <sup>a</sup>	46,3 ± 12,4 <sup>a</sup>	79,8 ± 34,9 <sup>a</sup>
	<b>I01</b>	78,8 ± 28,9 <sup>a</sup>	83,1 ± 39,1 <sup>bc</sup>	106,9 ± 30,1 <sup>ab</sup>
	<b>E+I01</b>	92,8 ± 30,7 <sup>ab</sup>	76,7 ± 19,5 <sup>ab</sup>	103,0 ± 27,1 <sup>ab</sup>
	<b>I01+E</b>	84,4 ± 31,2 <sup>ab</sup>	63,6 ± 23,2 <sup>ac</sup>	105,7 ± 29,6 <sup>ab</sup>
	<b>E+I01+A</b>	134,8 ± 53,1 <sup>b</sup>	125,3 ± 28,1 <sup>d</sup>	133,4 ± 25,2 <sup>b</sup>
<b>Teste F</b>	4,629	12,216	3,646	
<b>p-valor</b>	0,002	<0,001	0,007	

**(A)** 0,5%; **(B)** 0,25%; **(C)** 0,1%. Escovação ou imersão isoladas (E e I); Escovação seguido de imersão (E+I); Imersão seguido de escovação (I+E); Escovação, imersão e água (E+I+A). Concentração: 05 (0,5%), 025 (0,25%) 01 (0,1%).

*Interpretação: Letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças estatísticas entre os grupos. (ANOVA oneway – post-hoc Tukey).*

**Tabela 2** – Comparação da viabilidade celular (%) em concentrações diferentes dentro do mesmo protocolo.

		<b>Viabilidade Celular (%) Média ± DP</b>		
		<b>1º DIA</b>	<b>3º DIA</b>	<b>7º DIA</b>
<b>(A)</b>	<b>C</b>	100,0 ± 0,0 <sup>ab</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	<b>E</b>	70,0 ± 22,4 <sup>a</sup>	46,3 ± 12,4 <sup>a</sup>	79,8 ± 34,9 <sup>a</sup>
	<b>I05</b>	84,2 ± 32,7 <sup>ab</sup>	67,3 ± 17,3 <sup>ab</sup>	98,6 ± 16,7 <sup>a</sup>
	<b>I025</b>	110,4 ± 37,8 <sup>b</sup>	62,8 ± 17,6 <sup>ab</sup>	115,6 ± 32,1 <sup>a</sup>
	<b>I01</b>	78,8 ± 28,9 <sup>ab</sup>	83,1 ± 39,1 <sup>bc</sup>	106,9 ± 30,1 <sup>a</sup>
	<b>Teste F</b>	3,132	8,206	2,294
<b>p-valor</b>	0,025	<0,001	0,076	
<b>(B)</b>	<b>C</b>	100,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	<b>E</b>	70,0 ± 22,4 <sup>a</sup>	46,3 ± 12,4 <sup>a</sup>	79,8 ± 34,9 <sup>a</sup>
	<b>E+I05</b>	87,8 ± 19,6 <sup>ab</sup>	58,2 ± 16,8 <sup>ab</sup>	97,2 ± 25,9 <sup>a</sup>
	<b>E+I025</b>	76,0 ± 16,0 <sup>ab</sup>	73,0 ± 14,7 <sup>b</sup>	100,9 ± 13,8 <sup>a</sup>
	<b>E+I01</b>	92,8 ± 30,7 <sup>ab</sup>	76,7 ± 19,5 <sup>b</sup>	103,0 ± 27,1 <sup>a</sup>
	<b>Teste F</b>	3,238	17,989	1,408
<b>p-valor</b>	0,022	<0,001	0,249	
<b>(C)</b>	<b>C</b>	100,0 ± 0,0 <sup>ab</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	<b>E</b>	70,0 ± 22,4 <sup>a</sup>	46,3 ± 12,4 <sup>a</sup>	79,8 ± 34,9 <sup>a</sup>
	<b>I05+E</b>	107,3 ± 18,0 <sup>b</sup>	76,2 ± 24,1 <sup>bc</sup>	103,9 ± 30,9 <sup>a</sup>
	<b>I025+E</b>	92,0 ± 35,5 <sup>ab</sup>	66,2 ± 20,1 <sup>ab</sup>	93,7 ± 26,5 <sup>a</sup>
	<b>I01+E</b>	84,4 ± 31,2 <sup>ab</sup>	63,6 ± 23,2 <sup>ab</sup>	105,7 ± 29,6 <sup>a</sup>
	<b>Teste F</b>	3,052	10,449	1,312
<b>p-valor</b>	0,028	<0,001	0,282	
<b>(D)</b>	<b>C</b>	100,0 ± 0,0 <sup>ab</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>bc</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>ab</sup>
	<b>E</b>	70,0 ± 22,4 <sup>a</sup>	46,3 ± 12,4 <sup>a</sup>	79,8 ± 34,9 <sup>a</sup>
	<b>E+I05+A</b>	131,5 ± 32,9 <sup>b</sup>	92,4 ± 15,1 <sup>b</sup>	118,0 ± 33,6 <sup>b</sup>
	<b>E+I025+A</b>	116,9 ± 37,2 <sup>b</sup>	125,0 ± 26,6 <sup>c</sup>	120,2 ± 26,9 <sup>b</sup>
	<b>E+I01+A</b>	134,8 ± 53,1 <sup>b</sup>	125,3 ± 28,1 <sup>c</sup>	133,4 ± 25,2 <sup>b</sup>
	<b>Teste F</b>	5,492	25,062	5,238
<b>p-valor</b>	0,001	<0,001		

**(A)** Escovação ou imersão isoladas (E e I); **(B)** Escovação seguido de imersão (E+I); **(C)** Imersão seguido de escovação (I+E); **(D)** Escovação, imersão e água (E+I+A). Concentração: 05 (0,5%), 025 (0,25%) 01 (0,1%).

*Interpretação: Letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças estatísticas entre os grupos. (ANOVA oneway – post-hoc Tukey).*

**Tabela 3** – Comparação intra-grupo da viabilidade celular (%) nos tempos de análise da citotoxicidade.

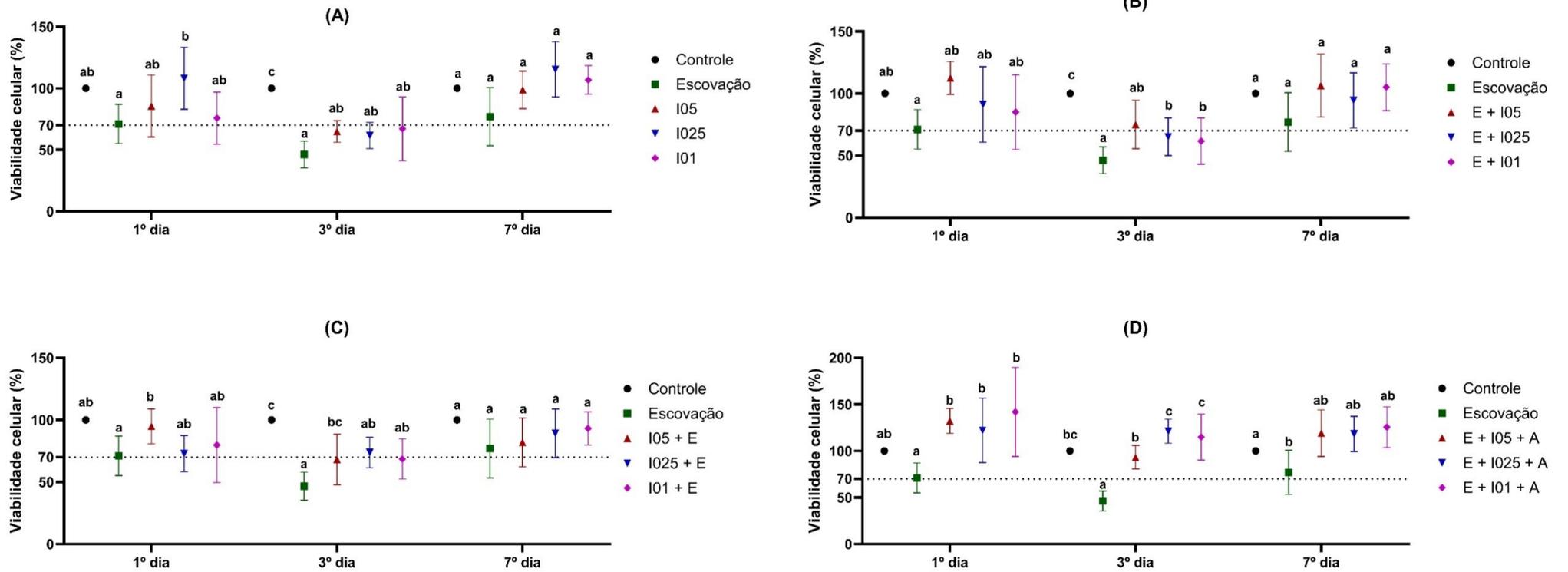
Grupo	Viabilidade Celular (%) Média ± DP			Teste F	p-valor
	1º DIA	3º DIA	7º DIA		
<b>C</b>	100,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	-	-
<b>E</b>	70,0 ± 22,4 <sup>AB</sup>	46,3 ± 12,4 <sup>A</sup>	79,8 ± 34,9 <sup>B</sup>	4,443	<b>0,029</b>
<b>I05</b>	84,2 ± 32,7 <sup>AB</sup>	67,3 ± 17,3 <sup>A</sup>	98,6 ± 16,7 <sup>B</sup>	6,090	<b>0,031</b>
<b>I025</b>	110,4 ± 37,8 <sup>B</sup>	62,8 ± 17,6 <sup>A</sup>	115,6 ± 32,1 <sup>B</sup>	11,272	<b>0,001</b>
<b>I01</b>	78,8 ± 28,9 <sup>A</sup>	83,1 ± 39,1 <sup>A</sup>	106,9 ± 30,1 <sup>A</sup>	2,062	0,160
<b>E+I05</b>	87,8 ± 19,6 <sup>B</sup>	58,2 ± 16,8 <sup>A</sup>	97,2 ± 25,9 <sup>B</sup>	10,546	<b>0,001</b>
<b>E+I025</b>	76,0 ± 16,0 <sup>A</sup>	73,0 ± 14,7 <sup>A</sup>	100,9 ± 13,8 <sup>B</sup>	14,254	<b>&lt;0,001</b>
<b>E+I01</b>	92,8 ± 30,7 <sup>A</sup>	76,7 ± 19,5 <sup>A</sup>	103,0 ± 27,1 <sup>A</sup>	1,819	0,194
<b>I05+E</b>	107,3 ± 18,0 <sup>B</sup>	76,2 ± 24,1 <sup>A</sup>	103,9 ± 30,9 <sup>AB</sup>	4,452	<b>0,029</b>
<b>I025+E</b>	92,0 ± 35,5 <sup>A</sup>	66,2 ± 20,1 <sup>A</sup>	93,7 ± 26,5 <sup>A</sup>	3,599	0,051
<b>I01+E</b>	84,4 ± 31,2 <sup>AB</sup>	63,6 ± 23,2 <sup>A</sup>	105,7 ± 29,6 <sup>B</sup>	6,023	<b>0,011</b>
<b>EI05A</b>	131,5 ± 32,9 <sup>A</sup>	92,4 ± 15,1 <sup>A</sup>	118,0 ± 33,6 <sup>A</sup>	3,693	<b>0,048</b>
<b>E+I025+A</b>	116,9 ± 37,2 <sup>A</sup>	125,0 ± 26,6 <sup>A</sup>	120,2 ± 26,9 <sup>A</sup>	0,215	0,809
<b>E+I01+A</b>	134,8 ± 53,1 <sup>A</sup>	125,3 ± 28,1 <sup>A</sup>	133,4 ± 25,2 <sup>A</sup>	0,167	0,848

Escovação ou imersão isoladas (E e I); Escovação seguido de imersão (E+I); Imersão seguido de escovação (I+E); Escovação, imersão e água (E+I+A). Concentração: 05 (0,5%), 025 (0,25%) 01 (0,1%).

*Interpretação: Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatísticas entre os grupos. ANOVA de repetições múltiplas – post-hoc Sidak.*

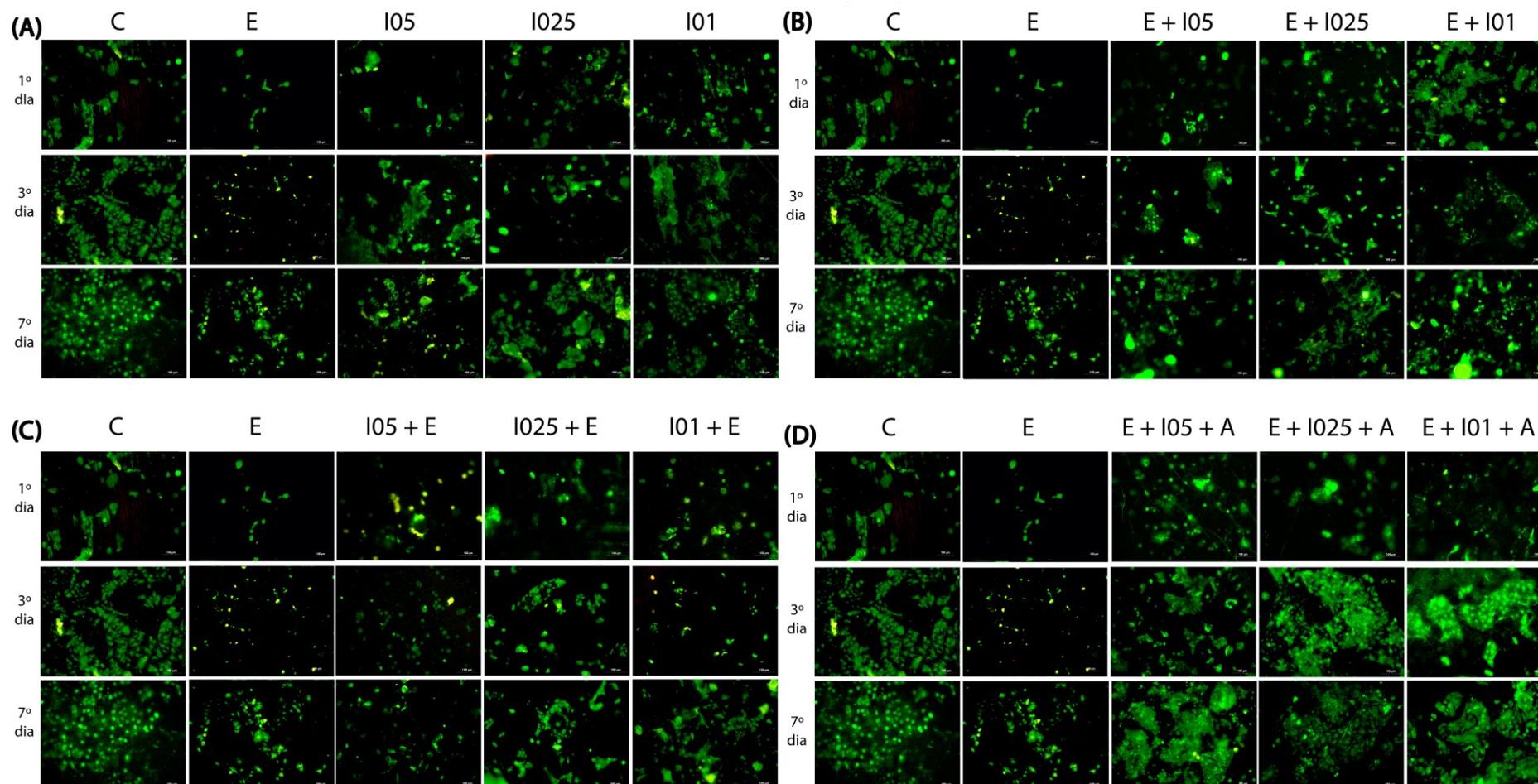
**Figura 1** – Porcentagem de viabilidade celular (%) em 1, 3 e 7 dias de cultivo após tratamentos os protocolos testados.

(A) Protocolos isolados (E e I); (B) Escovação seguido de imersão (E+I); (C) Imersão seguido de escovação (I+E); (D) Escovação, imersão, e água (E+I+A).



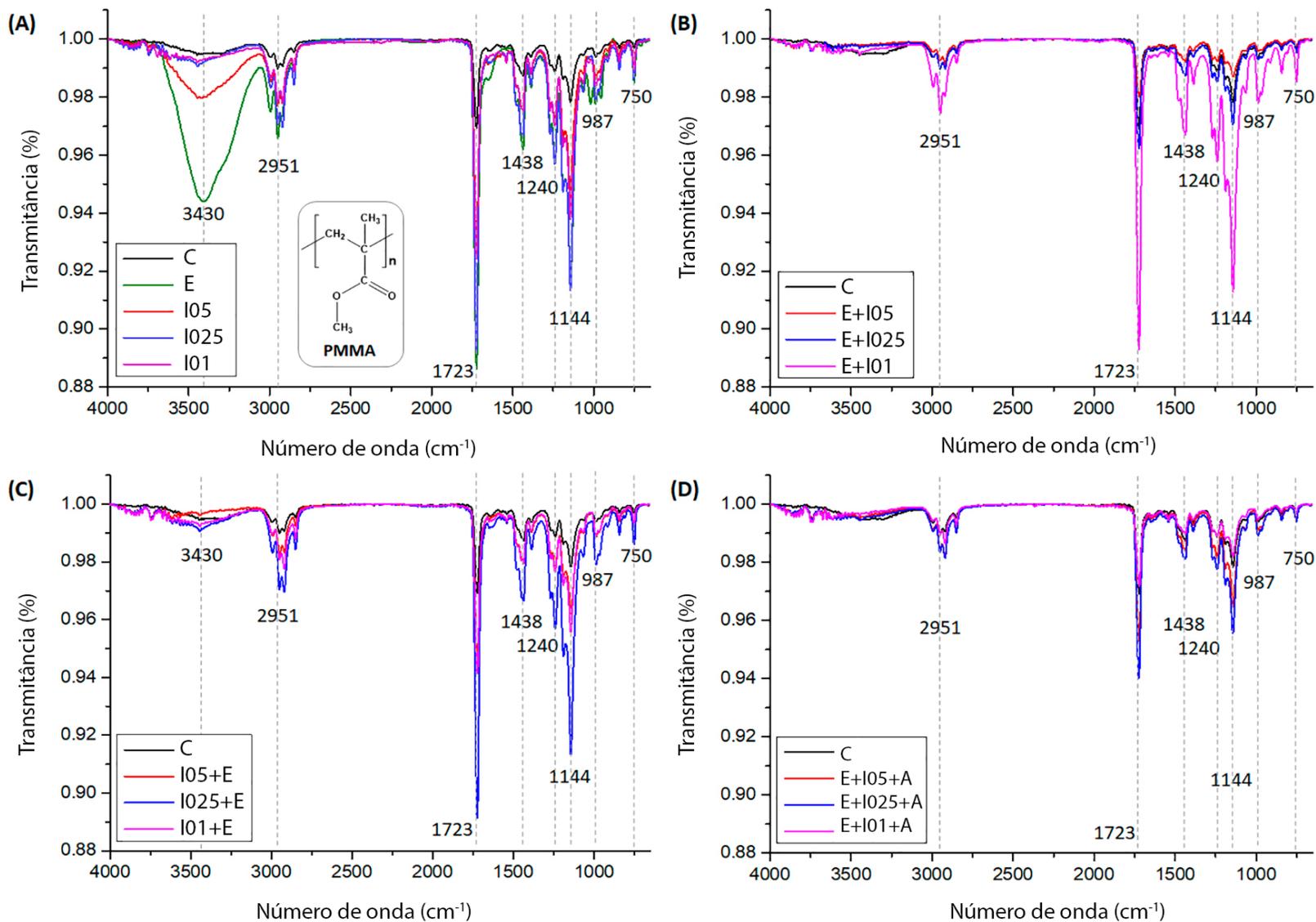
**Figura 2** – Morfologia celular por epifluorescência em 1, 3, 7 dias após os protocolos testados.

**(A)** Protocolos isolados (E e I); **(B)** Escovação seguido de imersão (E+I); **(C)** Imersão seguido de escovação (I+E); **(D)** Escovação, imersão, e água (E+I+A).



**Figura 3** – Número de onda em espectroscopia de infravermelho de Fourier (FTIR) indicando alterações na composição molecular do polimetilmetacrilato após protocolos de higienização.

(A) Protocolos isolados (E e I); (B) Escovação seguido de imersão (E+I); (C) Imersão seguido de escovação (I+E); (D) Escovação, imersão, e água (E+I+A).



## REFERÊNCIAS

- Alkaltham NS, Aldhafiri RA, Al-Thobity AM, Alramadan H, Aljubran H, Ateeq IS, Khan SQ, Akhtar S, Gad MM. 2023. Effect of denture disinfectants on the mechanical performance of 3D-printed denture base materials. *Polymers*. 26;15(5):1175. doi: 10.3390/polym15051175
- Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S. 2014. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human mesenchymal stem cells. *J Contemp Dent Pract*. 1;15(4):473-81. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1565
- Akin H, Tugut F, Polat ZA. 2015 In vitro comparison of the cytotoxicity and water sorption of two different denture base systems. *J Prosthodont*. 24(2):152-5. doi: 10.1111/jopr.12162.
- Arruda CNF, Salles MM, Badaró MM, de Cássia Oliveira V, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Paranhos H. 2017. Effect of sodium hypochlorite and *Ricinus communis* solutions on control of denture biofilm: A randomized crossoverclinical trial. *Prosthet Dent* 117(6):729-734. doi: 10.1016/j.prosdent.2016.08.035
- Arruda CNF, Salles MM, Badaró MM, Sorgini DB, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO. 2018 Evaluation of biofilm removal and adverse effects on acrylic resin by diluted concentrations of sodium hypochlorite and *Ricinus communis* solutions. *Gerodontology*. doi: 10.1111/ger.12348. Epub ahead of print.
- Atalay S, Çakmak G, Fonseca M, Schimmel M, Yilmaz B. 2022. Effect of different disinfection protocols on the surface properties of CAD-CAM denture base materials. *J Prosthet. Dent*. 8:S0022-3913(21)00692-2. doi: 10.1016/j.prosdent.2021.12.007.
- Baba Y, Sato Y, Owada G, Minakuchi S. 2018. Effectiveness of a combination denture-cleaning method versus a mechanical method: comparison of denture cleanliness, patient satisfaction, and oral health-related quality of life. *J Prosthodont Res*. Jul;62(3):353-358. doi: 10.1016/j.jpor.2018.01.005.
- Badaró MM, Salles MM, Leite VMF, Arruda CNF, Oliveira VC, Nascimento CD, Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. 2017. Clinical trial for evaluation of *Ricinus communis* and sodium hypochlorite as denture cleanser. *J Appl Oral Sci*; 25(3):324-334. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0222
- Badaró MM, Bueno FL, Arnez RM, Oliveira VC, Macedo AP, de Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. 2020. The effects of three disinfection protocols on *Candida* spp., denture stomatitis, and biofilm: A parallel group randomized controlled trial. *J Prosthet Dent.*; 124(6):690-698. doi: 10.1016/j.prosdent.2019.09.024.
- Badaró MM, Salles MM, de Arruda CNF, Oliveira VC, de Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. 2017. In vitro analysis of surface roughness of acrylic resin exposed to the combined hygiene method of brushing and immersion in *Ricinus communis* and sodium hypochlorite. *J Prosthodont*. 26(6):516-521.
- Badaró MM, Bueno FL, Makrakis LR, Araújo CB, Oliveira VC, Macedo AP, Paranhos HFO, Watanabe E, Silva-Lovato CH. 2021 Action of disinfectant solutions on adaptive

- capacity and virulence factors of the *Candida* spp. biofilms formed on acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 3;29:e20210024. doi: 10.1590/1678-7757-2021-0024.
- Coelho IRP, Silva-Lovato CH, Arruda CNF, Münchow EA, Silveira GRC, Carvalho RF, Badaró MM. 2023. Denture cleanser effect on resilient liners with distinct optical characteristics. *Am J Dent.* 36(2):62-68
- Coulthwaite L, Verran J. 2007. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci.*;64(4):180-9. doi: 10.1080/09674845.2007.11732784.
- Duyck J, Vandamme K, Krausch-Hofmann S, Boon L, Keersmaecker K, Jalon E, 2016. Impact of denture cleaning method and overnight storage condition on denture biofilm mass and composition: A cross-over randomized clinical trial. *PLoS One.* 11(1), e0145837.
- Durkan R, Ayaz EA, Bagis B, Gurbuz A, Ozturk N, Korkmaz FM. 2013 Comparative effects of denture cleansers on physical properties of polyamide and polymethyl methacrylate base polymers. *Dent Mater J.* 32(3):367-75. doi: 10.4012/dmj.2012-110
- Duan G, Zhang C, Li A, Yang X, Lu L, Wang X. 2008. Preparation and Characterization of Mesoporous Zirconia Made by Using a Poly (methyl methacrylate) Template. *Nanoscale Res Lett.* 28;3(3):118-22. doi: 10.1007/s11671-008-9123-7
- Emami E, Nguyen PT, Almeida FR, Feine JS, Karp I, Lavigne G, Huynh N. 2014. The effect of nocturnal wear of complete dentures on sleep and oral health related quality of life: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 15, 358. doi: 10.1186/1745-6215-15-358.
- Ercalik-Yalcinkaya S, Özcan M. 2015. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. *J Prosthodont.*;24(4):271-8. doi: 10.1111/jopr.12208.
- Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 13(2):113-7. doi: 10.1590/s0103-64402002000200007.
- Feldmann A, Alexandrino LD, Santos VRD, Kapczynski MP, Fraga S, Silva WJD, Mengatto CM. 2022. Effect of a vinegar-hydrogen peroxide mixture on the surface properties of a cobalt-chromium alloy: A possible disinfectant for removable partial dentures. *J Prosthet Dent.* 127(6):929-935. doi: 10.1016/j.prosdent.2020.10.028.
- Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, Meredith P, Solie C, Avery D, Deal Chandler N; 2011. American College of Prosthodontists. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Prosthodont.*; 20 Suppl 1:S1-S12. doi: 10.1111/j.1532-849X.2010.00683.x.
- França R, Mbeh DA, Samani TD, Le Tien C, Mateescu MA, Yahia L, Sacher E. 2013. The effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and in vitro cytotoxicity

of several kinds of chitosan. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. doi: 10.1002/jbmb.32964.

- Jeong HY, Kim YS, Jeong M. 2010. Variations of oral cavity environment according to sodium lauryl sulfate concentration of toothpaste. *The Journal of the Korea Contents Association*, 10(8), 240-248.
- Gagnaire F, Marignac B, Hecht G, Héry M. Sensory irritation of acetic acid, hydrogen peroxide, peroxyacetic acid and their mixture in mice. 2002. *Ann Occup Hyg*; 46(1):97-102. doi: 10.1093/annhyg/mef005.
- Gendreau, L, Loewy ZG. 2011. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 20(4):251-260. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x.
- Hawley B, Casey M, Virji MA, Cummings KJ, Johnson A, Cox-Ganser J. Respiratory symptoms in hospital cleaning staff exposed to a product containing hydrogen peroxide, peracetic acid, and acetic acid. 2017. *Ann Work Expo Health*; 15;62(1):28-40. doi: 10.1093/annweh/wxx087.
- Kabawat M, de Souza RF, Badaró MM, de Koninck L, Barbeau J, Rompré P, Emami E. 2014. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont*; 27(4):311-9. doi: 10.11607/ijp.3844.
- Kardaras G, Marcovici I, Rusu D, Dehelean C, Coricovac D, Iorio-Siciliano V, Stratul SI. 2023. In-Vitro Safety Evaluation of Sodium Hypochlorite (NaOCl) as Part of Step 2 and Maintenance Therapy Protocols in Patients with Periodontitis Stages III-IV. *Oral Health Prev Dent*, 21, 103-112.
- Khan I, Ahmad T, Manzoor N, Rizvi MA, Raza U, Premchandani S. 2020. Evaluating the role of local host factors in the candidal colonization of oral cavity: A review update. *Natl J Maxillofac Surg*. 169-175. doi: 10.4103/njms.NJMS\_161\_20.
- Khader GAC, Barboza ADS, Ribeiro JS, Ferreira ML, Cuevas-Suarez CE, Piva E, Lund RG. 2022. Novel polymethyl methacrylate modified with metal methacrylate monomers: biological, physicochemical, and optical properties. *Biofouling*; 38(3):250-259.
- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. 2018 *Cold Spring Harb Protoc*. 1;2018(6). doi: 10.1101/pdb.prot095505
- Mendes GC, Brandão TR, Silva CL. 2007. Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review. *Am J Infect Control*; 35(9):574-81. doi: 10.1016/j.ajic.2006.10.014
- Muñoz XL, Vergara CN, Fuentes JJ, Lozano CP. 2023. Medium-chain fatty acids as an alternative treatment for denture stomatitis in older people. *Clin Oral Investig*. 29:1-8. doi: 10.1007/s00784-023-04987-3.
- Oliveira JC, Aiello G, Mendes B, Urban VM, Campanha NH, Jorge JH. 2010. Effect of storage in water and thermocycling on hardness and roughness of resin materials for temporary restorations. *Mat Res* 13(3):355-9. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392010000300013>

- Orsi IA, Andrade VG, Bonato PS, Raimundo LB, Herzog DS, Borie E. 2011. Glutaraldehyde release from heat-polymerized acrylic resins after disinfection and chemical and mechanical polishing. *Braz Dent J*;22(6):490–6. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402011000600009>.
- Ortega-Llamas L, Quiñones-Vico MI, García-Valdivia M, Fernández-González A, Ubago-Rodríguez A, Sanabria-de la Torre R, Arias-Santiago S. 2022. Cytotoxicity and Wound Closure Evaluation in Skin Cell Lines after Treatment with Common Antiseptics for Clinical Use. *Cells*. 20;11(9):1395. doi: 10.3390/cells11091395.
- Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. 2016 Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. *Am J Dent*. J29(3):154-60.
- Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz, PC, Freitas KM, Peracini A. 2007 Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *Journal of Oral Rehabilitation*, 34(8):606-12. doi: 10.1111/j.1365-2842.2007.01753.x.
- Park SR, Kim YM, Choi BB, Kim JY. 2015. The effect of the cytotoxicity of sodium lauryl sulfate containing toothpaste on HaCaT and NIH-3T3 cells. *Journal of Korean society of Dental Hygiene*, 15(4), 719-725.
- Przybyłowska D, Mierzwińska-Nastalska E, Rubinsztajn R, Chazan R, Rolski D, Swoboda-Kopeć E. 2015. Influence of denture plaque biofilm on oral mucosal membrane in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Adv Exp Med Biol*. 839:25-30. doi: 10.1007/5584\_2014\_42.
- Ramage G, Zalewska A, Cameron DA, Sherry L, Murray C, Finnegan MB, Loewy ZG, Jagger DC. 2012. A comparative in vitro study of two denture cleaning techniques as an effective strategy for inhibiting *Candida albicans* biofilms on denture surfaces and reducing inflammation. *J Prosthodont*.; 21(7):516-22. doi: 10.1111/j.1532-849X.2012.00865.x.
- Ribeiro AB, Ribeiro AB, de Araújo CB, Fortes CV, Clemente LM, Paranhos HFO, Watanabe E, Salgado HC, Silva-Lovato CH. 2022. Effect of a hygiene protocol on denture-related stomatitis remission, local inflammatory factors, and hemodynamic responses by arterial pressure. *Antibiotics* (Basel). 28;11(10):1320. doi: 10.3390/antibiotics11101320
- Rideout K, Teschke K, Dimich-Ward H, Kennedy SM. 2005. Considering risks to healthcare workers from glutaraldehyde alternatives in high-level disinfection. *J Hosp Infect*; 59(1):4-11. doi: 10.1016/j.jhin.2004.07.003
- Ribeiro AB, Araújo CB, Silva LEV, Fazan-Junior R, Salgado HC, Ribeiro AB, Fortes CV, Bueno FL, de Oliveira VC, Paranhos HFO, Watanabe E, Silva-Lovato CH. 2019 Hygiene protocols for the treatment of denture-related stomatitis: local and systemic parameters analysis - a randomized, double-blind trial protocol. *Trials* 29;20(1):661. doi: 10.1186/s13063-019-3854-x
- Rocha MM, Carvalho AM, Coimbra FCT, Arruda CNF, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Paranhos HFO. 2021. Complete denture hygiene solutions:

- antibiofilm activity and effects on physical and mechanical properties of acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 3;29:e20200948. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0948.
- Salles MM, Badaró MM, Arruda CN, Leite VM, Silva CH, Watanabe E, Oliveira VC, Paranhos HFO. 2015. Antimicrobial activity of complete denture cleanser solutions based on sodium hypochlorite and *Ricinus communis* – A randomized clinical study. *J Appl Oral Sci.* 23(6):637-642. doi: 10.1590/1678-775720150204.
- Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. 2014. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol.* 18(1): 81-85. doi: 10.4103/0973-029X.141325
- Slaughter RJ, Watts M, Vale JA, Grieve JR, Schep LJ. 2019. The clinical toxicology of sodium hypochlorite. *Clin Toxicol (Phila).* 57(5):303-311. doi: 10.1080/15563650.2018.1543889
- Sordi MB, Curtarelli RB, da Silva IT, Fongaro G, Benfatti CAM, Magini RS, Cruz ACC. 2021. Effect of dexamethasone as osteogenic supplementation in in vitro osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *J Mater Sci Mater Med.* 19;32(1):1. doi: 10.1007/s10856-020-06475-6.
- Soto AF, Mendes EM, Arthur RA, Negrini TC, Lamers ML, Mengatto CM. 2019. Antimicrobial effect and cytotoxic activity of vinegar-hydrogen peroxide mixture: A possible alternative for denture disinfection. *J Prosthet Dent.* 121(6):966.e1-966.e6. doi: 10.1016/j.prosdent.2019.02.019.
- Soto AF, Arthur RA, Kapczinski MP, Lamers ML, Mengatto CM. 2019. Keratinocyte Cytotoxicity of Peracetic Acid Used as Sterilizing Agent for Implant Scaffolds. *Ann Plast Surg.*;83(1):99-103. doi: 10.1097/SAP.0000000000001967.
- Soto-Quintero A, González-Alva P, Coveló A, Hernández MA. 2022. Study of the in vitro degradation and characterization of the HaCat keratinocytes adherence on electrospun scaffolds based polyvinyl alcohol/sodium alginate *J. Appl. Polym. Sci.*, 139(39), e52775. <https://doi.org/10.1002/app.52775>
- Uğur Aydın Z, Akpınar KE, Hepokur C, Erdönmez D. 2018. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz Oral Res.* 29;32:e119. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0119
- [ISO] International Standards Organization. 2009. ANSI/AAMI/ISO 10993-5: 2009/(R)2014. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Arlington, VA: *The Association for the Advancement of Medical Instrumentation.*

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Frente aos dados apresentados, os protocolos de higienização com imersão overnight posterior em água apresentam menor citotoxicidade, independente das concentrações do NaOCl analisadas. Os protocolos de higienização com imersão overnight em água foram os mais inertes sobre a composição molecular do PMMA. A associação dos métodos mecânico e químico independente da ordem de instituição demonstram não causar citotoxicidade residual. A escovação isolada com sabão líquido neutro é o protocolo mais citotóxico dentre os avaliados.

## REFERÊNCIAS

- [1] ARRUDA CNF, SALLES MM, BADARÓ MM, OLIVEIRA VC, MACEDO AP, SILVA-LOVATO CH, PARANHOS HFO. Effect of sodium hypochlorite and Ricinus communis solutions on control of denture biofilm: A randomized crossover clinical trial. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 117, n. 6, p. 729-734, 2017.
- [2] BABA Y, SATO Y, OWADA G, MINAKUCHI S. Effectiveness of a combination denture-cleaning method versus a mechanical method: comparison of denture cleanliness, patient satisfaction, and oral health-related quality of life. *Journal of Prosthodontic Research*, v. 62, n. 3, p. 353-358, 2018.
- [3] BADARÓ MM, BUENO FL, MAKRAKIS LR, ARAÚJO CB, OLIVEIRA VDC, MACEDO AP, SILVA-LOVATO CH. Action of disinfectant solutions on adaptive capacity and virulence factors of the Candida spp. biofilms formed on acrylic resin. *Journal of Applied Oral Science*, v. 29, 2021.
- [4] COULTHWAITE L, VERRAN, J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *British Journal of Biomedical Science*, v. 64, n. 4, p. 180-189, 2007.
- [5] EMAMI E, NGUYEN PTH, ALMEIDA FR, FEINE JS, KARP I, LAVIGNE G, HUYNH N. The effect of nocturnal wear of complete dentures on sleep and oral health related quality of life: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, v. 15, p. 1-7. 2014.
- [6] FELTON D, COOPER L, DUQUM I, MINSLEY G, GUCKES A, HAUG S, CHANDLER, ND et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *Journal of Prosthodontics* v. 20, p. S1-S12, 2011.
- [7] FIGUERÔA RMS, CONTERNO B, ARRAIS CAG, SUGIO CYC, URBAN VM, NEPELENBROEK KH. Porosity, water sorption and solubility of denture base acrylic resins polymerized conventionally or in microwave. *Journal of Applied Oral Science*, v. 26, 2018.
- [8] GENDREAU L, LOEWY ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*, v. 20 p.251-260, 2011.
- [9] GLEIZNYS A; ZDANAČIENĖ, E; ŽILINSKAS, J. Candida albicans importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*, v. 17, n. 2, p. 54-66, 2015.
- [10] GOIATO MC, FREITAS E, DOS SANTOS D, DE MEDEIROS R, SONEGO M. Acrylic resin cytotoxicity for denture base - Literature review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*; v. 24. p. 679–86. 2015.
- [11] KABAWAT M, SOUZA RF, BADARÓ MM, KONINCK L, BARBEAU J, ROMPRÉ P, EMAMI E. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont*. 2014 v. 27 n. 4, p. 311-9.
- [12] MASETTI, ARBELÁEZ MIA, PAVARINA AC, SANITÁ PV, JORGE JH. Cytotoxic potential of denture base and reline acrylic resins after immersion in disinfectant solutions. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 120, n. 1, p. 155. e1-155. e7, 2018.

- [13] MILWARD P, KATECHIA D, MORGAN MZ. Knowledge of removable partial denture wearers on denture hygiene. *British Dental Journal*, v. 215, n. 10, p. E20-E20, 2013.
- [14] MENGATTO CM, MARCHINI L, BERNARDES LAS, GOMES SC, SILVA AM, RIZZATTI-BARBOSA, CM. Partial denture metal framework may harbor potentially pathogenic bacteria. *Journal of Advanced Prosthodontics*. Seoul: Korean Acad Prosthodontics, v. 7, n. 6, p. 468-474, 2015.
- [15] NEJATIAN T, PEZESHKI S, SYED, AUY. Acrylic denture base materials. *Advanced Dental Biomaterials*. Woodhead Publishing, 2019. p. 79-104.
- [16] O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.
- [17] PARANHOS HFO, PERACINI A, PISANI MX, OLIVEIRA VC, SOUZA RF, SILVA-LOVATO CH. Color stability, surface roughness and flexural strength of an acrylic resin submitted to simulated overnight immersion in denture cleansers. *Brazilian Dental Journal*, v. 24, p. 152-156, 2013.
- [18] PASIGA BD. The ability of elderly to clean plaque on full denture prosthesis using toothbrush with special grip design. *Int J Dent Med Sci Res*, v. 2, n. 1, p. 22-7, 2018.
- [19] PROCÓPIO ALF, SILVA RA, MACIEL JG, SUGIO CYC, SOARES S, URBAN VM, NEPPELENBROE KH. Antimicrobial and cytotoxic effects of denture base acrylic resin impregnated with cleaning agents after long-term immersion. *Toxicology in Vitro*, v. 52, p. 8-13, 2018.
- [20] RYU M, KOBAYASHI T, KAWAMUKAI E, QUAN G, FURUTA T. Cytotoxicity assessment of residual high-level disinfectants. *Biocontrol science*, 18(4), 217-220. 2013.
- [21] RIVERA-HIDALGO F, SHULMAN JD, BEACH MM. The association of tobacco and other factors with recurrent aphthous stomatitis in an US adult population. *Oral diseases*, v. 10, n. 6, p. 335-345, 2004.
- [22] SAHM BD, BOTELHO AL, AGNELLI JAM, REIS, AC. Relation of physicochemical properties and accumulation of microorganisms in acrylic resins with antimicrobial properties: a systematic review. *Polymer Bulletin*, p. 1-13, 2022.
- [23] SALLES MM, OLIVEIRA VC, SOUZA RF, SILVA CHL, PARANHOS HFO. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning—in vitro evaluation. *Brazilian Oral Research*, v. 29, p. 1-6, 2015.
- [24] SESMA N, LAGANÁ DC, MORIMOTO S, GIL C. Effect of denture surface glazing on denture plaque formation. *Brazilian Dental Journal*, v. 16, p. 129-134, 2005.
- [25] SOTO AF, MENDES EM, ARTHUR, RA, NEGRINI TC, LAMERS ML, MENGATTO CM. Antimicrobial effect and cytotoxic activity of vinegar-hydrogen peroxide mixture: A possible alternative for denture disinfection. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 121, n. 6, p. 966. e1-966. e6, 2019.
- [26] VALENTINI-MIOSO F, MASKE TT, CENCI MS, BOSCATO N, PEREIRA-CENCI T. Chemical hygiene protocols for complete dentures: A crossover randomized clinical trial. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 121, n. 1, p. 83-89, 2019.

- [27] YARBOROUGH A, COOPER L, DUQUM I, MENDONÇA G, MCGRAW K, STONER L. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. ***Journal of Prosthodontics***, n.25, v.4, p. 288-301. 2016.
- [28] ZAFAR, MS. Prosthodontic applications of polymethyl methacrylate (PMMA): An update. ***Polymers***, v. 12, n. 10, p. 2299, 2020.