



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM DENTÍSTICA**

**ANA PAULA SPONCHIADO**

**ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO CRUZADO DE  
HIGIENIZAÇÃO COM ULTRASSOM DE PRÓTESES TOTAIS  
EM PACIENTES INSTITUCIONALIZADOS**

**Curitiba  
2018**

**ANA PAULA SPONCHIADO**

**ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO CRUZADO DE  
HIGIENIZAÇÃO COM ULTRASSOM DE PRÓTESES TOTAIS  
EM PACIENTES INSTITUCIONALIZADOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Dentística.**

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa**

**Curitiba**

**2018**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Ciências da Vida  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

#### TERMO DE APROVAÇÃO

ANA PAULA SPONCHIADO

ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO CRUZADO DE HIGIENIZAÇÃO COM ULTRASSOM DE  
PRÓTESES TOTAIS EM PACIENTES INSTITUCIONALIZADOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Dentística**.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Orlando M. Tanaka  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Evelise Machado de Souza  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Adriane Souza de Siqueira  
Curso de Odontologia, UPPR

Prof. Dr. Maria Pedrosa Leão  
Curso de Odontologia, UPPR

Curitiba, 28 de novembro de 2018.

Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho CEP 80215-901 Curitiba - Paraná - Brasil  
Fone: (41) 3271-1637 Site: [www.pucpr.br](http://www.pucpr.br) Email: [ppgou@pucpr.br](mailto:ppgou@pucpr.br)

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.*

*(John F. Kennedy)*

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho aos meus pais Anair Gonçalves Sponchiado e Nelson Sponchiado, ao meu esposo Leandro Delyson França, a meu amado filho Pedro Sponchiado França e a Deus.*

## *Agradecimentos*

*A Deus, por me dar forças para chegar até o final desta jornada.*

*Ao meu esposo Leandro Delyson França por sua paciência em mais uma etapa de estudos de minha vida profissional. Ao meu filho Pedro Sponchiado França por dar alegria a minha jornada.*

*Aos meus pais, Nelson e Anair Sponchiado, por todo o incentivo, suporte, encorajamento e apoio para que este sonho se tornasse realidade.*

*Agradecimento a minha secretária Ana Paula Barbosa dos Santos Diniz por toda a amizade, apoio e ajuda com a organização do material para a fase experimental da pesquisa.*

*Agradeço a Sra Pedrolina Barbosa Diniz por todo o carinho e por ter aceitado ser participante do estudo piloto da pesquisa.*

*Agradecimento aos meus colegas de doutorado por toda a sua empatia, parceria e apoio. Agradecimentos especial às minhas amigas doutorandas Cláudia Helena Dietrich, Bruna Carla Karpinski e Bruna Locks, sem as quais esta conquista não seria possível.*

*Agradecimento a Profa Dra Moira Pedroso Leão por ser minha inspiração profissional. Por todos os seus ensinamentos e encorajamentos para a vida de cirurgiã-dentista e docente.*

*Agradecimento especial a Rosimeire Takaki Rosa por todo o conhecimento transmitido e toda a ajuda na fase laboratorial da pesquisa.*

*Agradecimento ao Prof Osires e seu filho Arthur Beltrame Canciglieri que viabilizaram a fase de escaneamento e cálculo da área das próteses totais.*

*Agradecimento a Eva Alice Cavalli por toda a ajuda na fase experimental.*

*Agradecimento às instituições de longa permanência de idosos e aos idosos que viabilizaram esta pesquisa.*

*Agradecimento ao Prof Dr Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa por sua coorientação neste trabalho.*

*Agradecimento ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Rodrigo Nunes Rached por sua inteligência, ensinamentos e competência.*

*A todos vocês, meu cordial e sincero obrigado de coração.*

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

S763e  
2018  
Sponchiado, Ana Paula  
Estudo clínico randomizado cruzado de higienização com ultrassom de  
próteses totais em pacientes institucionalizados / Ana Paula Sponchiado ;  
orientador, Rodrigo Nunes Rached ; coorientador, Edvaldo Antonio Ribeiro  
Rosa. -- 2018  
67 f. : il. ; 30 cm  
  
Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2018.  
Inclui bibliografias  
  
1.Odontologia. 2. Prótese total. 3. Higiene bucal. 4. Ultrassom. 5. Idosos.  
I. Rached, Rodrigo Nunes. II. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro.  
- III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação  
em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.6

## SUMÁRIO

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| ARTIGO EM PORTUGUÊS .....                               | 1  |
| Resumo .....                                            | 2  |
| Introdução .....                                        | 3  |
| Materiais e métodos .....                               | 4  |
| Resultados .....                                        | 17 |
| Discussão .....                                         | 18 |
| Conclusão .....                                         | 21 |
| Referências .....                                       | 22 |
| ARTIGO EM INGLÊS .....                                  | 27 |
| Title page .....                                        | 27 |
| Abstract .....                                          | 28 |
| Introduction .....                                      | 29 |
| Material and Methods .....                              | 30 |
| Results .....                                           | 43 |
| Discussion .....                                        | 44 |
| Conclusion .....                                        | 47 |
| References .....                                        | 48 |
| ANEXO .....                                             | 53 |
| Parecer de comitê de ética em pesquisa .....            | 53 |
| TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido ..... | 52 |
| Normas para publicação - JAOS .....                     | 59 |

# **ARTIGO EM PORTUGUÊS**

## **Ensaio clínico randomizado cruzado de higienização com ultrassom de próteses totais em pacientes institucionalizados.**

Ana Paula Sponchiado

Curso de Odontologia, Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil.

Herbert Koch Filho

Curso de Odontologia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Rosimeire Takaki Rosa

Curso de Farmácia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Programa de pós-graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Rodrigo Nunes Rached

Programa de pós-graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

## **AUTOR CORRESPONDENTE**

Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached

Pontifícia Universidade Católica- PR (Programa de Pós-graduação em Odontologia- PPGO)

Rua Imaculada Conceição, 1155. Curitiba, PR, Brazil, 80215-901.

Telefone: 55 41 3271-1637

E-mail: r.rached@pucpr.br; ronura@gmail.com

## 1   **Resumo**

2   **Introdução:** A elaboração de um protocolo prático e eficaz de higienização de  
3   próteses totais para internados em instituições de longa permanência para idosos  
4   (ILPIs) é de extrema importância para a prevenção da estomatite protética e de  
5   doenças sistêmicas relacionadas. **Objetivo:** Comparar a eficácia do banho de  
6   ultrassom em relação escovação tradicional na higienização de próteses totais de  
7   pacientes sob internação em ILPIs. **Materiais e Métodos:** Um estudo clínico  
8   cruzado randomizado foi conduzido em uma amostra de 17 idosos  
9   institucionalizados usuários de próteses totais superiores. Os protocolos de  
10   limpeza foram escovação e banho de ultrassom, ambos aplicados com detergente  
11   neutro líquido. A biomassa de biofilme foi estimada pelo ensaio de redução do  
12   brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) e a carga  
13   microbiológica específica (UFC) para *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., e  
14   *Candida* spp. foi quantificado por meio de cultura seletivo e diferencial. Os testes  
15   estatísticos utilizados foram teste U de Mann-Whitney e teste de postos assinados  
16   por Wilcoxon ( $\alpha=5\%$ ). **Resultados:** Apenas o método do ultrassom reduziu  
17   estatisticamente do baseline para o tratamento a biomassa de biofilme (MTT). As  
18   contagens de *Streptococcus* spp. foram reduzidas pelos dois métodos de  
19   higienização. Porém, *Staphylococcus* spp., e *Candida* spp. apenas foram  
20   reduzidas pelo método de ultrassom. **Conclusão:** O banho de ultrassom  
21   demonstrou ser um método alternativo viável para a higienização mecânica de  
22   próteses totais em ILPIs.

23  
24   **Palavras-chave:** Prótese total. Higiene bucal. Biofilmes. Instituição de longa  
25   permanência de idosos. Ultrassom.

## 1 Introdução

2       Usuários de próteses totais internados em instituições de longa  
3 permanência de idosos (ILPIs) podem ser incapazes de manter a higiene de suas  
4 próteses totais(1–3) por motivo de doença, demência ou baixa coordenação  
5 motora, o que os tornam dependentes do suporte de cuidadores(4). Apesar desses  
6 profissionais considerarem a higiene oral importante, algumas barreiras dificultam  
7 a realização da higiene oral em pacientes institucionalizados, tais como  
8 comportamento de recusa pelos pacientes, falta de tempo e sobrecarga de  
9 trabalho(5).

10       A disseminação sistêmica de microrganismos a partir de infecções orais  
11 associadas ao acúmulo de biofilme em próteses totais pode levar a condições  
12 sistêmicas de grande preocupação, tais como endocardite infecciosa, pneumonia  
13 por aspiração e doença pulmonar obstrutiva crônica, sobretudo em pacientes  
14 idosos dependentes(6–8). Sendo assim, fica claro que a higienização das próteses  
15 totais para o controle do biofilme é vital para redução do risco de acometimento de  
16 tais doenças(7).

17       A candidose bucal, na forma de estomatite protética, acomete cerca de 65%  
18 dos pacientes usuários de próteses totais superiores e está geralmente associada  
19 a uma higiene oral deficitária(9). A estomatite protética pode ser agravada por  
20 trauma, uso contínuo da prótese, reação alérgica à base da prótese e aos produtos  
21 de limpeza das próteses, hipossalivação, dieta inadequada e uso de  
22 antibióticos(10,11). A *Candida albicans* é o principal agente etiológico da  
23 estomatite protética, em conjunto com outros microrganismos patogênicos e  
24 oportunistas, tais como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Lactobacillus*  
25 spp.(12–14).

26       A limpeza de próteses totais pode ser feita utilizando agentes químicos  
27 (hipocloritos, peróxidos, enzimas, enxaguatórios bucais) e métodos físicos  
28 (escovação, vibração sônica e ultrassônica) (15,16). A desinfecção química é um  
29 procedimento que se mostra mais efetivo quando associada ao controle mecânico  
30 do biofilme da superfície das próteses(17,18). A escovação associada ou não a  
31 sabão, dentifrício ou abrasivos é o método mais comumente relatado para  
32 higienização de próteses totais (7,16,19). O banho de ultrassom tem se mostrado  
33 um método viável de limpeza, principalmente para internos comprometidos

1 cognitivamente e com deficiências físicas(20–22). Sugere-se que esse método seja  
2 associado a uma solução de limpeza que seja eficaz na remoção de biofilme, além  
3 de ser de fácil acesso e baixo custo(19). Um produto de limpeza ideal para próteses  
4 totais deve remover matéria orgânica e inorgânica, não ser tóxico, ser de baixo  
5 custo e de fácil manuseio, além de reduzir o biofilme(17).

6 Uma considerável variedade de produtos químicos para a limpeza de  
7 próteses totais está disponível(23,24); contudo, a dificuldade de aquisição e de  
8 manuseio correto limitam sua adoção em ILPIs(22). A utilização de produtos de  
9 limpeza corriqueiros é uma opção a se considerar, dada sua facilidade de aquisição  
10 e eficácia em suprir as necessidades dos portadores de próteses totais(25).

11 O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a eficácia do banho de  
12 ultrassom na higienização de próteses totais de pacientes internados em ILPIs  
13 comparada a escovação tradicional. Já o objetivo específico foi determinar a  
14 eficácia dos métodos de higienização (escovação e ultrassom) a partir da biomassa  
15 do biofilme e da estimativa de células por área basal da prótese total antes e após  
16 a aplicação dos métodos propostos. As hipóteses nulas do estudo foram: 1) Não  
17 haverá diferença entre os dois métodos de higienização das próteses totais para a  
18 variável biomassa de biofilme; 2) Não há diferença entre os dois métodos de  
19 higienização das próteses totais para a carga microbiana específica; 3) não há  
20 diferença entre baseline e tratamento para as variáveis estudadas.

## 21 22 **Materiais e Métodos**

23 O presente estudo foi registrado no REBEC (RBR-3jj84f) e aprovado pelo  
24 Comitê de Ética Institucional (Número do protocolo 2.225.015).

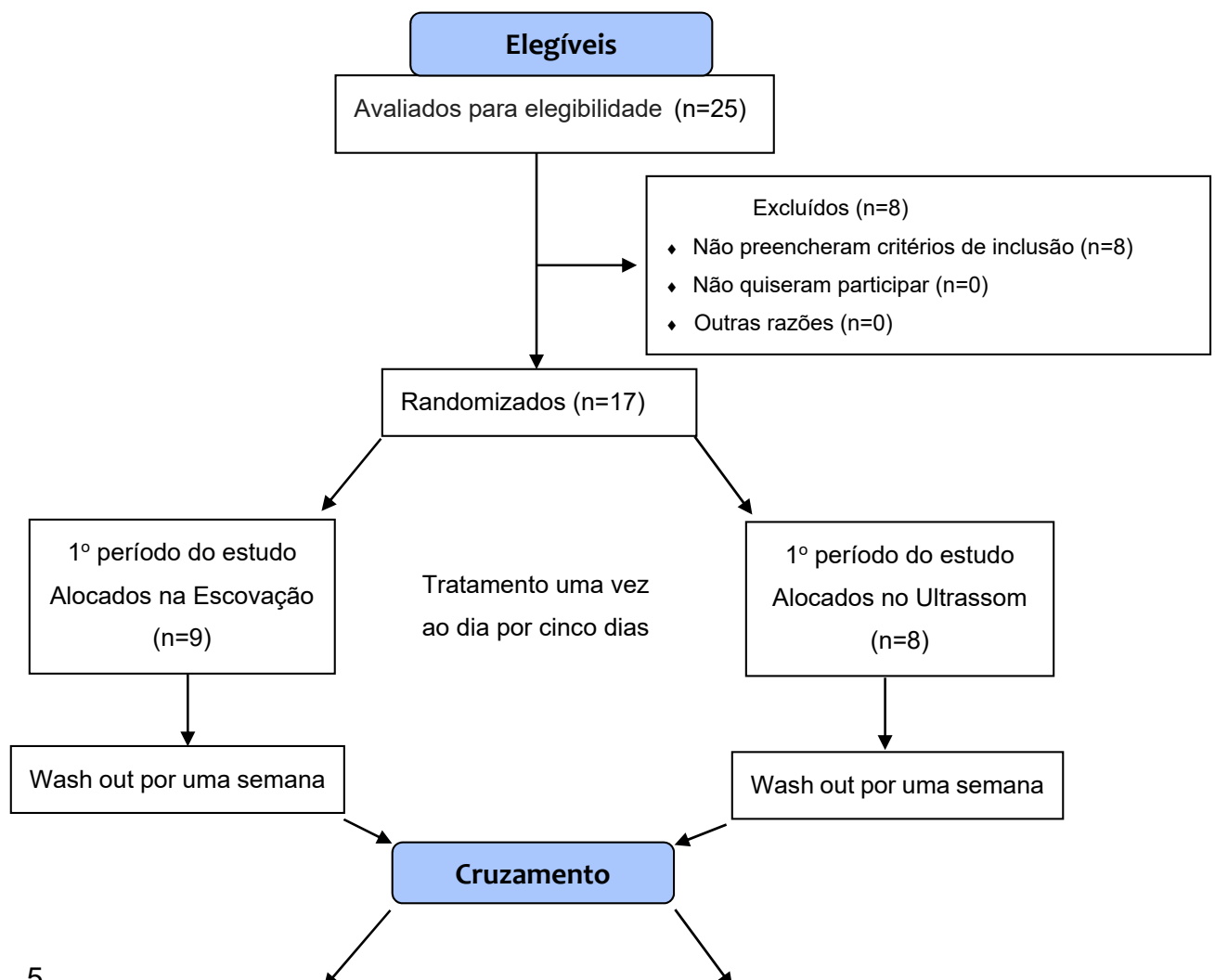
### 25 26 *Seleção da amostra*

27 A amostra foi composta por indivíduos selecionados entre os residentes de  
28 duas instituições LTCIs localizadas na região metropolitana da cidade de Curitiba  
29 (Paraná, Brasil). A pesquisadora principal avaliou previamente as próteses totais  
30 dos indivíduos institucionalizados. Os critérios de inclusão foram idade igual ou  
31 superior a 60 anos, ser totalmente dependente, apresentar edentulismo completo  
32 e utilizar prótese total superior convencional em resina acrílica há pelo menos um  
33 ano. Os critérios de exclusão foram utilização de próteses totais superiores  
34 convencionais fraturadas, consertadas ou reembasadas, apresentar estomatite

protética, estar em uso ou ter feito uso de antibióticos, antifúngicos ou corticóides até o prazo de três meses antes da pesquisa, utilizar adesivos para próteses, ser fumante e fazer uso de próteses com acúmulo de cálculo.

Um cálculo do tamanho da amostra para um ensaio de não-inferioridade sem diferenças entre um tratamento (ultrassom) para outro (escovação) indicou um tamanho de amostra de 13 pacientes para uma potência de 80%(26).

O fluxograma CONSORT (27) está apresentado na Figura 1, ilustrando a seleção dos participantes para o estudo, alocação, acompanhamento e análise. As instituições e respectivos internos foram convidados a participar da pesquisa após a apresentação dos riscos, benefícios e objetivos do presente estudo. A amostra final foi composta por 17 indivíduos (4 homens e 13 mulheres) com idade média de 72,5 anos (no intervalo de 62 a 86 anos). Foram contatados os responsáveis legais dos indivíduos e realizados os esclarecimentos sobre a pesquisa e os mesmos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.



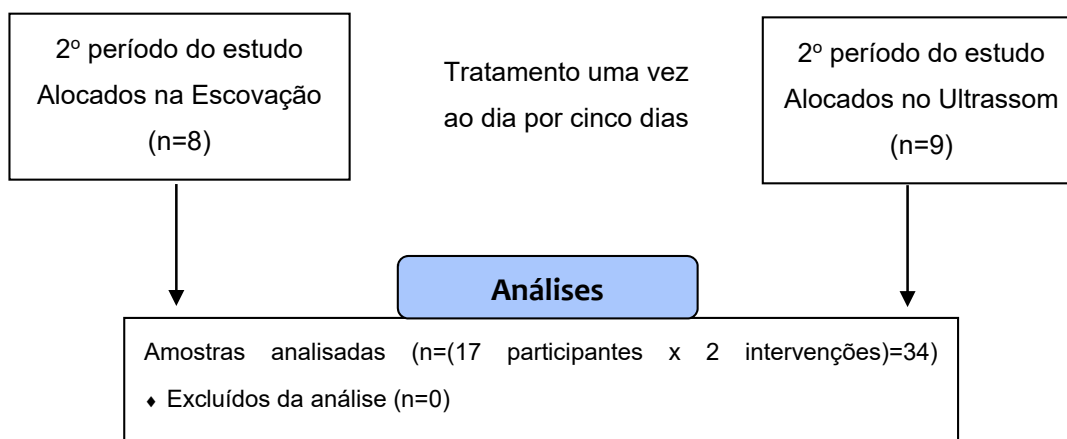


Figura 1. Fluxograma CONSORT.

### Desenho do estudo e métodos de higienização

O estudo foi do tipo cruzado, randomizado e duplo cego. Todas as próteses totais foram expostas as duas intervenções, por cinco dias cada.

*Escovação manual com detergente neutro:* Escovação uma vez ao dia em horário fixo por dois minutos(22) durante cinco dias, utilizando escova macia para limpeza de próteses (Twister, Colgate, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) associada a detergente de louça neutro sem glicerina (Ypê, Goiânia, Goiás, Brasil). Em seguida, as próteses totais foram enxaguadas em água corrente e devolvidas ao paciente.

*Banho de ultrassom com solução de detergente neutro:* As próteses foram inseridas individualmente em potes de vidro identificados e tampados contendo 100ml de água da torneira e uma gota de detergente de louça neutro, os quais foram submetidos à vibração ultrassônica (Cristofoli, Campo Mourão, Paraná, Brasil) a 160 watts uma vez ao dia em horário fixo por 15 minutos(21,28) durante cinco dias. Na sequência, as próteses totais foram enxaguadas em água corrente e devolvidas ao paciente.

A randomização foi feita por meio de sorteio por um dos pesquisadores (R.N.R.) utilizando cartões que continham os métodos a serem pesquisados. Durante a fase experimental, foi fixado um cartaz com a sequência de higienização randomizada das próteses de cada indivíduo e um *checklist* diário no leito de cada paciente. Nas paredes dos banheiros foram fixados cartazes para que a

1 higienização das próteses totais não fosse executada por mais ninguém além da  
2 cuidadora previamente treinada.

3 Antes de iniciar a pesquisa, realizou-se o cálculo da área total das próteses  
4 totais superiores em cm<sup>2</sup>. Este cálculo foi importante para poder determinar a  
5 quantidade de biomassa de biofilme e de carga microbiana por área das próteses  
6 totais. A prótese total superior de cada paciente foram moldadas em alginato  
7 (Jeltrate, Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 2) e replicadas em  
8 resina acrílica opaca (Jet, Clássico, Campo Limpo Paulista, São Paulo, Brasil)  
9 (Figura 3). As réplicas foram digitalizadas por um escâner odontológico (Ceramill  
10 map400, Amann Girrbach, Koblach, Austria) (Figura 4) e as imagens obtidas foram  
11 analisadas utilizando o programa Solid Edge v.20 (Siemens PLM, Plano, USA,  
12 2007) (Figura 5).

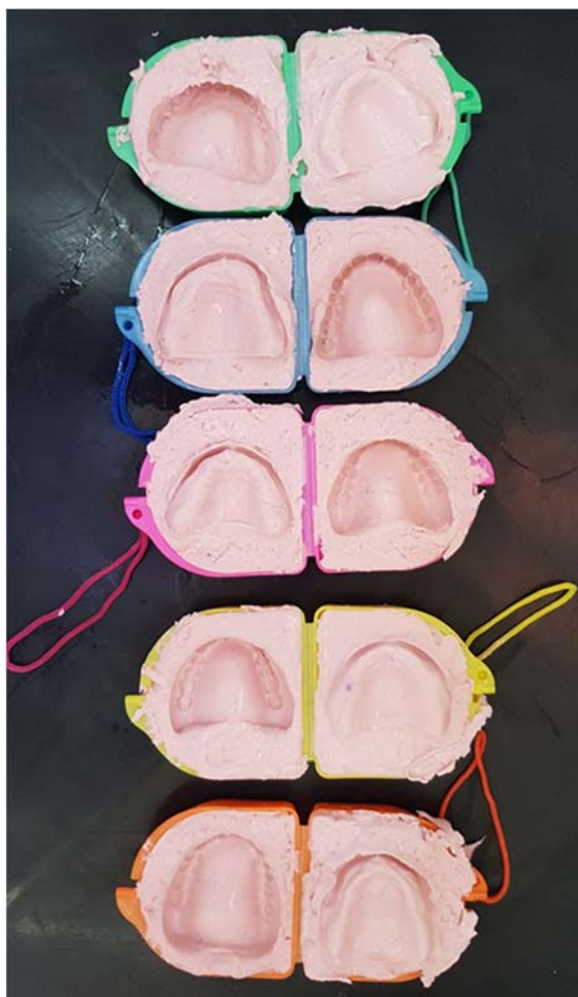


Figura 2: Moldes das próteses totais



Figura 3: Prótese total replicada e pintada para escaneamento



Figura 4: Escâner odontológico (Ceramill map400, Amann Girrbach, Koblach, Austria)

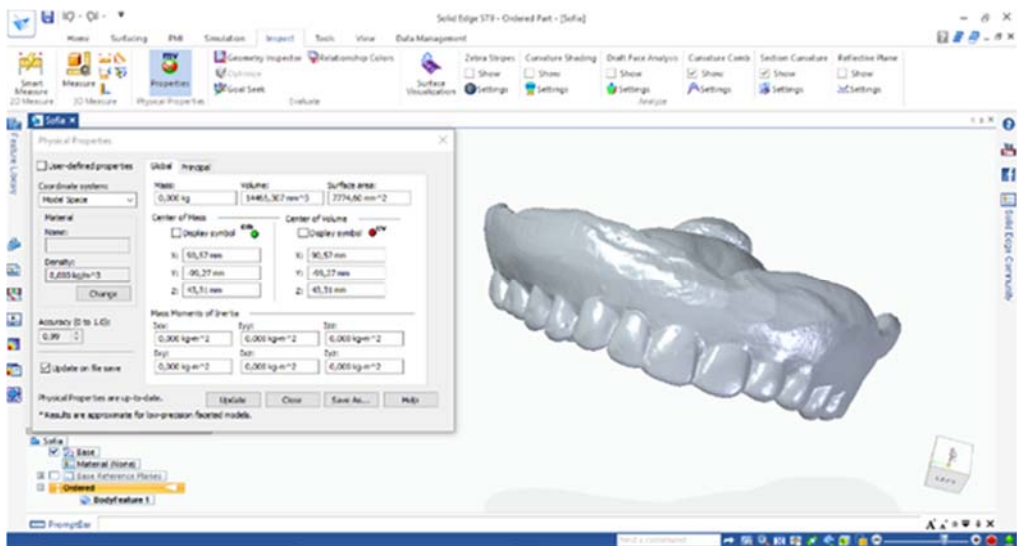


Figura 5: Programa Solid Edge v.20 (Siemens PLM, Plano, USA, 2007)

1  
2 Para que todas as próteses iniciassem a pesquisa no mesmo patamar de  
3 higiene, as mesmas foram imersas em vinagre (ácido acético a 4,2%) por 10  
4 minutos (Figura 6) e na sequência escovadas com pasta de digluconato de  
5 clorexidina 2% (Maquira, Maringá, Paraná, Brasil) por dois minutos(29) (Figura 7).  
6 As próteses foram lavadas com água corrente e entregues aos pacientes. Caso o  
7 paciente possuísse prótese total inferior, a mesma também passava pelo processo  
8 descrito para a prótese total superior. Os pacientes utilizaram as próteses  
9 normalmente por dois dias(29), sendo as mesmas higienizadas por escovação uma  
10 vez ao dia com água e sabão, como era o protocolo de higiene das ILPIs.



Figura 6: Próteses imersas em solução de ácido acético a 4,2%

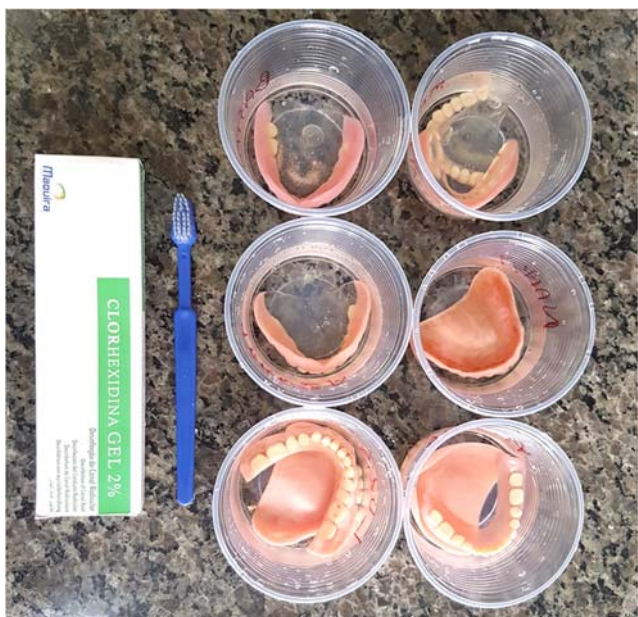


Figura 7: Próteses escovadas com pasta de digluconato de clorexidina 2%

Após esse período, possíveis restos alimentares foram eliminados a partir de um turbilhão indireto de água de torneira dentro de um pote plástico de volume de 500 mL contendo uma prótese cada por 30 segundos (Figura 8). Na sequência, as próteses foram imersas 100 mL de soro fisiológico estéril (Figura 9). Os conjuntos foram levados a cuba ultrassônica por 15 minutos (Figura 10) e as suspensões obtidas foram consideradas “baseline” nas análises microbiológicas.



Figura 8: Turbilhão indireto de água para eliminar possíveis debris das próteses



Figura 9: próteses imersas em 100ml de soro fisiológico



Figura 10: prótese imersas em soro fisiológico sendo sonicadas por 15 minutos

- 1
- 2        Após essa coleta, as próteses foram novamente desinfetadas por imersão
- 3        em digluconato de clorexidina 0,12% (Colgate, São Bernardo do Campo, São
- 4        Paulo, Brasil) por 15 minutos (Figura 11), seguida de escovação com gel de
- 5        clorexidina 2% (Maquira, Maringá, Paraná, Brasil), por 2 minutos (Figura 12) e
- 6        devolvidas aos pacientes, os quais foram expostos aos tratamentos experimentais.



Figura 11: Próteses em imersão em digluconato de clorexidina 0,12%, por 15 minutos.



Figura 12: Próteses escovadas com gel de clorexidina 2% por 2 minutos

1 Cada um dos métodos de higienização, escovação (Figura 13) e ultrassom  
2 (Figura 14), foi conduzido por cinco dias consecutivos.



Figura 13: Próteses submetidas ao método de escovação



Figura 14: Próteses submetidas ao método ultrassom

3  
4 Após a aplicação de cada um dos métodos, as próteses foram imersas em  
5 vidros esterilizados identificados contendo 100 mL de soro fisiológico (Figura 15).  
6 Os conjuntos foram levados a cuba ultrassônica por 15 minutos (Figura 16) e as  
7 suspensões obtidas foram consideradas “tratamentos” nas análises  
8 microbiológicas.

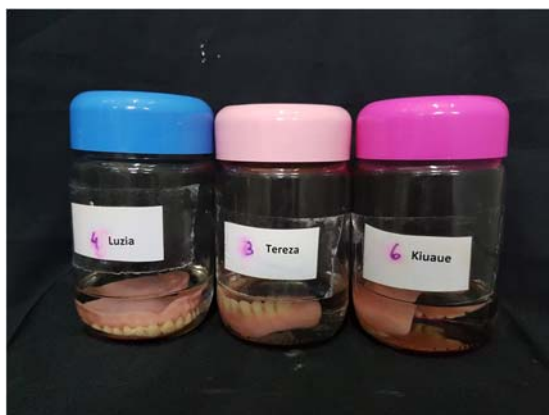


Figura 15: Próteses imersas em 100ml de soro fisiológico



Figura 16: Prótese imersas em soro fisiológico sendo sonicadas por 15 minutos

9  
10 Na sequência, realizou-se período de “washout” de uma semana, no qual as  
11 próteses totais eram escovadas uma vez ao dia com sabão, como era costume das  
12 ILPIs. Decorrido o wash out, as próteses foram novamente desinfetadas por  
13 imersão em digluconato de clorexidina 0,12% (Colgate, São Bernardo do Campo,  
14 São Paulo, Brasil), por 15 minutos e escovação com gel de clorexidina 2%

(Maquira, Maringá, Paraná, Brasil), por 2 minutos e devolvidas aos pacientes. Na sequência ocorreu o cruzamento e os métodos foram reaplicados como já descrito.

As suspensões “baseline” e “tratamento”, conduzidas ao laboratório de microbiologia e foram novamente sonicadas em cuba ultrassônica (modelo 2840D, Odontobrás, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (Figura 17), por 20 minutos, para desagregação máxima dos biofilmes.



Figura 17: Banho de ultrassom, 2840D, Odontobrás, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Alíquotas de 500  $\mu$ L foram recolhidas para quantificação da carga microbiana específica. O restante foi utilizado para estimativa de biomassa pelo ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)(30) (Figura 18).

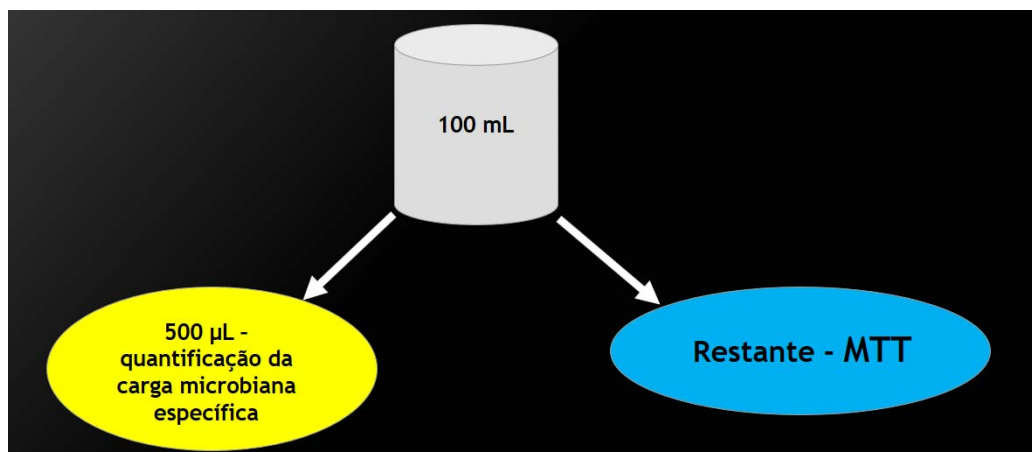


Figura 18: Esquema da diluição inicial

#### *Quantificação da carga microbiana específica*

O protocolo de diluição, a seguir, foi determinado após ensaio-piloto com prótese total de um participante.

1 Alíquotas de 500 µL das suspensões foram combinadas com 500 µL de  
2 água destilada e agitadas em vórtex (modelo AP56, Phoenix, Araraquara, São  
3 Paulo, Brasil) a 1500 RPM, por 30 segundos. Foram tomadas alíquotas de 100 µL  
4 que foram combinadas com 900 µL de água destilada e agitadas em vórtex a 1500  
5 RPM, por 30 segundos (Figura 19).



Figura 19: esquema da diluição

7  
8 Foram tomadas alíquotas de 100 µL das suspensões diluídas acima, que  
9 foram plaqueadas em duplicata em meios de cultura seletivos e diferenciais  
10 Chromocult (Merck, Alemanha), Ágar Manitol Salgado (NewProv, Pinhais, Brasil) e  
11 Ágar Sabouraud Dextrose (NewProv, Pinhais, Brasil) (Figura 20). Esses meios  
12 permitem a quantificação presuntiva de *Streptococcus* spp. (após exame de  
13 confirmação por Gram), *Staphylococcus* spp. e *Candida* spp., respectivamente.  
14 Placas contendo meios para quantificação de bactérias foram incubadas a 37 °C  
15 (Orion-502, Fanem, São Paulo, Brasil) e placas com meios para leveduras foram  
16 incubadas a 28 °C. As incubações foram conduzidas por 72 horas, em atmosfera  
17 normóxica.



Figura 20: Meios de cultura seletivos e diferenciais inoculados

Decorridos os tempos de incubação, a carga microbiana específica das próteses foi determinada por contagem do número de colônias crescidas que apresentavam fenótipos indicativos dos gêneros (UFC = unidades formadoras de colônias), seguida da correção com fatores de diluição. A densidade microbiana específica foi obtida se dividindo os valores numéricos das UFC pelas áreas das próteses (cm<sup>2</sup>).

#### *Estimativa da biomassa de biofilme pelo ensaio de redução do MTT*

As suspensões sonicadas foram centrifugadas a 4500 ×g (BE-4004, Bioeng, Curitiba), por 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e foram adicionados 1,5 mL de água estéril (Figura 21). Após ressuspensão e transferência para microtubos, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 ×g (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), por um minuto. Após remoção do sobrenadante, foram



1 acrescentados 500  $\mu\text{L}$  de MTT 1  $\text{mg/mL}$  e os microtubos foram incubados a 37  $^{\circ}\text{C}$ ,  
 2 por três horas. A cada hora, os microtubos foram agitados em vórtex a 1500 RPM,  
 3 por 30 segundos (Figura 22). Ao término da incubação, foram acrescentados 500  
 4  $\mu\text{L}$  de água destilada aos microtubos, que foram agitados e novamente  
 5 centrifugados por três minutos. Os sobrenadantes foram removidos e foram  
 6 acrescentados 200  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico aos sedimentos. Após agitação, por  
 7 30 segundos, os conteúdos foram separados a 10.000  $\times g$ , por um minuto (Figura  
 8 23). Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foram recolhidas e transferidas para  
 9 poços de placas de leitura de fundo chato. As densidades ópticas da formazana  
 10 formada foram medidas em leitora TP-Reader (Thermoplate) a 540 nm. Os valores  
 11 de densidade óptica foram divididos pelas áreas das respectivas próteses. Os  
 12 resultados finais foram expressos como  $\text{OD}_{540}/\text{cm}^2$  (Figura 24).

Figura 21: Esquema da centrifugação inicial

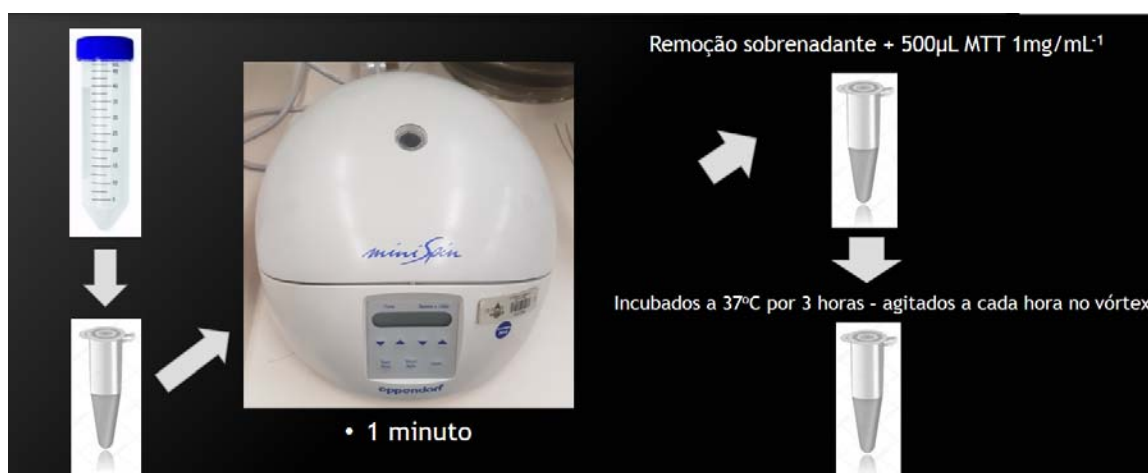


Figura 22: Esquema da segunda centrifugação e acréscimo do MTT



Figura 23: Esquema da preparação para o teste do MTT

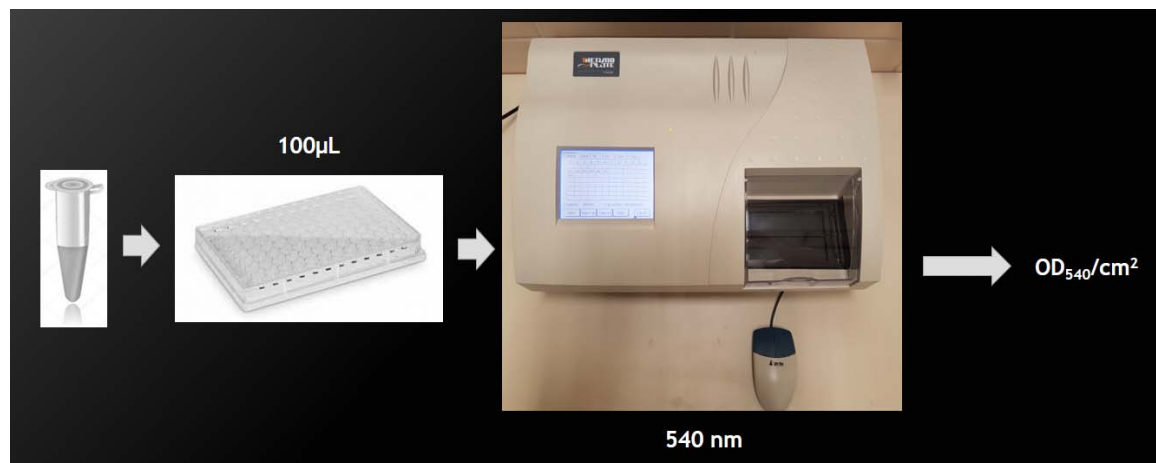


Figura 24: Esquema representando a leitura do teste do MTT

Tanto a quantificação da carga microbiana específica, quanto a estimativa de biomassa pelo ensaio de redução do MTT, foram conduzidas por um pesquisador (A.P.S.) cegado em relação aos tratamentos experimentais conduzidos.

#### *Análise estatística*

As análises foram conduzidas com o Statistical Package for the Social Science 24.0 (SPSS Inc). Os resultados foram analisados quanto à normalidade pelos testes de Kolmogorov-Smirnov com correlação de significância de Lilliefors e de Shapiro-Wilk. As comparações agrupadas segundo “método de limpeza” foram feitas pelo teste U de Mann-Whitney. A análise de efeitos entre grupos foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis, e a comparação *post-hoc* entre os grupos foi feita pelo teste de Dunn. As comparações entre “baseline” e “tratamento” foram feitas pelo teste de postos assinados por Wilcoxon. Todos os testes foram conduzidos com nível de significância de 5%.

#### **Resultados**

O teste de Mann-Whitney revelou diferença significativa entre os métodos de limpeza para a variação da biomassa de biofilme no baseline ( $p < 0.05$ ). O teste de Wilcoxon mostrou que somente o método de limpeza do ultrassom reduziu estatisticamente os valores da biomassa de biofilme do baseline para o tratamento ( $p < 0.05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias e desvios padrão para massa de biofilme (expressas como OD<sub>540</sub>/cm<sup>2</sup>) por microrganismos, de acordo com os métodos de limpeza no baseline e no tratamento.

|                  | Baseline         | Tratamento       |           |
|------------------|------------------|------------------|-----------|
| <b>Escovação</b> | 21.43 (25.27) Aa | 16.27 (17.91) Aa | $p=0.084$ |
| <b>Ultrassom</b> | 31.96 (17.89) Ba | 9.42 (8.89) Ab   | $p=0.000$ |
|                  | $p=0.024$        | $p=0.209$        |           |

Letras maiúsculas nas linhas comparam métodos. Letras minúsculas nas colunas comparam baseline e tratamento.

A comparação entre os métodos escovação e ultrassom (teste U de Mann-Whitney) antes e depois dos métodos de limpeza (teste de Wilcoxon) para carga específica de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. e estão representados na Tabela 2. Escovação e ultrassom mostraram diferentes contagens para *Streptococcus* spp. no baseline ( $p<0,05$ ). Diferenças antes e depois dos métodos foram detectadas para escovação na contagem de *Streptococcus* spp. e para ultrassom em todos os microrganismos.

Tabela 2. Médias e desvio padrão para carga específica de microrganismos *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Candida* spp. ( $\log_{10}$ -UFC/cm<sup>2</sup>) de acordo com os métodos de higiene e instituição.

|                            | Método de limpeza | Baseline       | Tratamento     |           |
|----------------------------|-------------------|----------------|----------------|-----------|
| <i>Streptococcus</i> spp.  | <b>Escovação</b>  | 2.49 (1.15) Aa | 1.82 (1.42) Ab | $p=0.003$ |
|                            | <b>Ultrassom</b>  | 3.18 (0.71) Ba | 1.82 (1.29) Ab | $p=0.000$ |
|                            |                   | $p=0.002$      | $p=0.911$      |           |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | <b>Escovação</b>  | 1.52 (1.30) Aa | 1.25 (1.17) Aa | $p=0.186$ |
|                            | <b>Ultrassom</b>  | 1.81 (1.28) Aa | 1.02 (1.16) Ab | $p=0.000$ |
|                            |                   | $p=0.287$      | $p=0.452$      |           |
| <i>Candida</i> spp.        | <b>Escovação</b>  | 2.26 (1.60) Aa | 2.08 (1.44) Aa | $p=0.136$ |
|                            | <b>Ultrassom</b>  | 2.39 (1.46) Aa | 1.82 (1.54) Ab | $p=0.000$ |
|                            |                   | $p=0.834$      | $p=0.524$      |           |

Letras maiúsculas nas linhas comparam métodos para cada microrganismo. Letras minúsculas nas colunas comparam baseline e tratamento para cada método de limpeza e microrganismo.

## Discussão

No presente estudo, o ultrassom reduziu significativamente o nível da biomassa de biofilme, do tempo baseline para o tratamento, rejeitando a primeira hipótese nula. Nos métodos de quantificação da carga microbiana específica, tanto escovação quanto ultrassom foram capazes de reduzir os *Streptococcus* spp.,

1 porém só o ultrassom foi capaz de reduzir *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp.,  
2 rejeitando a segunda hipótese nula. Como houve diferenças entre baseline e  
3 tratamento, a terceira hipótese nula também foi rejeitada.

4 A higienização das próteses totais com ácido acético a 4,2% e clorexidina  
5 dois dias antes da coleta “baseline”(29) teve como objetivo normalizar a carga  
6 microbiana das mesmas. Apesar disso, o grupo escovação diferiu do grupo  
7 ultrassom no “baseline” para a biomassa de biofilme e para carga de *Streptococcus*  
8 spp. Entretanto, não existem padrões universais de valores normais de biomassa  
9 para biofilmes dentais em próteses totais, enquanto que para *Streptococcus* spp.,  
10 as diferenças entre os valores médios de carga celular (máxima diferença de 1,35  
11 log<sub>10</sub>) devem representar a variabilidade normal (fluxo salivar, capacidade tampão  
12 da saliva, rugosidade da prótese total, microbiota individual) de contagens entre  
13 diferentes sujeitos.

14 Com relação a biomassa de biofilme no tratamento, não há diferenças entre  
15 a escovação e o ultrassom, fato que está de acordo com a literatura (22,29). Porém,  
16 quando se compara a capacidade de redução da biomassa do “baseline” para o  
17 tratamento, apenas o ultrassom tem essa capacidade. Alguns estudos também  
18 mostram maior efetividade do ultrassom, porém quando o mesmo é associado a  
19 tabletes efervescentes(21,22). Após o tratamento, ambos os métodos ou  
20 mantiveram os níveis *baseline* para biomassa de biofilme (supostamente reduzidos  
21 pela higienização prévia com clorexidina antes do experimento) ou reduziram  
22 esses níveis com significância estatística.

23 Quanto ao efeito dos métodos de higienização na contagem de  
24 microrganismos *Streptococcus* spp. foram aqueles que apresentaram redução  
25 estatisticamente significativa de contagens na comparação “baseline” e tratamento.  
26 Esta redução também aconteceu no estudo de Andrade IM *et al*(28) (2011), porém  
27 neste utilizaram a imersão em ultrassom associada a tabletes efervescentes. Já as  
28 contagens de *Staphylococcus* spp. e *Candida* spp. foram reduzidas apenas no  
29 método ultrassom. Nishi Y *et al*(21) (2014), também relatam diminuição nos níveis  
30 de *Candida* spp. com o uso do ultrassom, porém há associação com tabletes  
31 efervescentes. Já para Duyck *et al* (29) (2016) e Andrade IM *et al* (28) (2011) não  
32 houve redução de *Candida* spp. nem nos grupos escovação ou ultrassom  
33 associados a tabletes efervescentes ou não. Importante citar que no presente  
34 estudo os níveis de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Candida* spp. após o

1 tratamento não se elevaram em nenhum grupo, apenas mantiveram os níveis  
2 “baseline”.

3 Microrganismos ubíquos, como *Candida* spp., ocorrem tanto em pacientes  
4 saudáveis como naqueles apresentando estomatite protética. Particularmente, a  
5 *Candida albicans* é encontrada em próteses de pacientes apresentando alterações  
6 patológicas(9,14). Estudos relataram a dificuldade na redução dos níveis desse  
7 fungo, importante fator etiológico da estomatite protética, no biofilme multi-espécies  
8 das próteses totais, mesmo quando técnicas mecânicas de higienização são  
9 associadas à tabletes efervescentes(28,31,32).

10 Foi sugerido que o *Streptococcus* spp do biofilme de próteses totais criam  
11 uma barreira de glucano que poderia limitar a exposição de outras espécies, entre  
12 elas, *Candida* spp., aos métodos químicos de limpeza(32). As maiores reduções  
13 das contagens de *Candida* spp. foram encontradas quando soluções bactericidas  
14 e/ou fungicidas foram associadas ao ultrassom(33). Baseado nessas premissas,  
15 é possível propor que uma associação poderia ser eficaz, pois a limpeza com o  
16 ultrassom é capaz de desestabilizar as camadas superficiais do biofilme da prótese  
17 total, que contém glucanos produzidos por *Streptococcus* spp. Essa ruptura  
18 exporia as *Candida* spp. que se encontram nas camadas mais profundas do  
19 biofilme, à ação de produtos químicos(32–34).

20 Os *Staphylococcus* spp. estão ligados a pneumonia que acomete muitos  
21 idosos residentes de ILPIs (6) e no presente estudo apenas o método de ultrassom  
22 foi capaz de reduzir significativamente a concentração destes microrganismos na  
23 próteses totais.

24 Estudos que avaliam os métodos de limpeza adotados por usuários de  
25 próteses totais indicam a escovação e o uso de água e dentífrico como os mais  
26 comuns(7,16,19). A vantagem do ultrassom frente à escovação reside no fato de  
27 muitos pacientes geriátricos que usam próteses totais apresentarem dificuldade  
28 motora para escovar suas próteses totais(21). A limpeza ultrassônica de próteses  
29 não é uma técnica comumente empregada na higiene de próteses em ILPIs,  
30 provavelmente, devido à falta de informação por parte dos cuidadores e dos  
31 internos. No entanto, essa modalidade de limpeza pode ser eficaz em um ambiente  
32 institucional que ofereça cuidados a idosos com deficiência física ou  
33 cognitiva(21,35,36). A adoção do banho de ultrassom por ILPIs se justifica por ser  
34 uma técnica cuja eficácia é pouco sensível à quantidade de cuidadores

1 responsáveis pela higienização de próteses totais, diferente do que se observa  
2 com o método de escovação. Apesar do uso do ultrassom requerer um treinamento  
3 dos cuidadores de idosos, a fácil operação do mesmo não desencoraja seu uso.  
4 Outras vantagens do banho de ultrassom incluem a redução do risco de infecção  
5 ocupacional (pela redução do contato dos cuidadores com as próteses) a eficácia  
6 do método e a possibilidade de higienizar mais de uma prótese no mesmo período  
7 de tempo.

8 O emprego de detergente doméstico como adjuvante de limpeza se justifica  
9 por sua comprovada ação emulsificante, que destrutura biofilmes. Some-se à  
10 isso, o fato de que a limpeza por ultrassom é mais eficaz na presença de um agente  
11 químico com tais características(17,28). Além disso, o detergente solubiliza  
12 proteínas e consequente reduz a adesão microbiana na superfície das próteses  
13 totais(23,37). Sua vantagem frente aos tabletes é centrada na não-abrasividade,  
14 baixo custo e facilidade de acesso(38).

15 A opção pela estimativa de biomassa de biofilme pelo ensaio de redução do  
16 MTT se mostrou acertada, pois é um recurso amplamente utilizado em várias  
17 áreas(39,40), porém de uso novo em odontologia, já tendo sido aplicado em e que  
18 em quantificações de conteúdo microbiano recobrimdo materiais dentários(41). O  
19 método de escores pós-retenção diferencial de corantes por biofilme, apesar de  
20 frequentemente citado na literatura(18,22,42,43), se mostra limitado e pouco  
21 preciso(29). A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) é outro teste também  
22 amplamente utilizado na avaliação do biofilme de próteses totais(29,44,45), com  
23 altos custos. Este não discrimina células vivas de células mortas, uma vez que é  
24 baseado na amplificação indistinta de segmentos de DNA, o que pode contribuir  
25 para uma estimativa equivocada da carga microbiana (29). Por sua vez, a  
26 estimativa de biomassa microbiana pela quantificação de formazana formada na  
27 redução do MTT é mais fidedigna na estimativa da carga de células vivas(40).

## 29 **Conclusão**

30 Após o tratamento, somente o método de ultrassom foi capaz de reduzir  
31 significativamente os valores da biomassa de biofilme e as contagens de *Candida*  
32 spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Sendo assim, o banho de

ultrassom demonstrou ser um método alternativo viável para a higienização mecânica de próteses totais em ILPIs.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer aos idosos que vivem nas instituições de longa permanência de idosos e a suas famílias que colaboraram e suportaram o projeto. E gostariam também de agradecer aos cuidadores e todos os funcionários dessas instituições, com um agradecimento especial para a cuidadora Eva Alice Cavalli, que atuou efetivamente durante a fase experimental.

## Referências

1. De Visschere L, de Baat C, Schols JMGA, Deschepper E, Vanobbergen J. Evaluation of the implementation of an 'oral hygiene protocol' in nursing homes: a 5-year longitudinal study. *Community Dent Oral Epidemiol*. Blackwell Publishing Ltd; 2011 Oct;39(5):416–25.
2. Zenthöfer A, Dieke R, Dieke A, Wege K-C, Rammelsberg P, Hassel AJ. Improving oral hygiene in the long-term care of the elderly-a RCT. *Community Dent Oral Epidemiol* [Internet]. 2013;41(3):261–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020631><http://doi.wiley.com/10.1111/cdoe.12007>
3. Gil-Montoya JA, de Mello ALF, Cardenas CB, Lopez IG. Oral Health Protocol for the Dependent Institutionalized Elderly. *Geriatr Nurs (Minneap)*. 2006;27(2):95–101.
4. Paradisl I, Landaverde G, Malo A-M, Velly AM. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. *J Can Dent Assoc*. 2002 Jan;68(1):39–45.
5. Gibney J, Wright C, Sharma A, Naganathan V. Nurses' knowledge, attitudes, and current practice of daily oral hygiene care to patients on acute aged care wards in two Australian hospitals. *Spec Care Dent*. 2015;35(6):285–93.
6. Mylotte JM. Nursing Home-Associated Pneumonia. Vol. 23, *Clinics in Geriatric Medicine*. 2007. p. 553–65.
7. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. Vol.

- 64, British Journal of Biomedical Science. 2007. p. 180–9.
8. Scannapieco FA, Shay K. Oral health disparities in older adults: Oral bacteria, inflammation, and aspiration pneumonia. *Dent Clin North Am.* 2014;58(4):771–82.
9. Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *CommunityDentOral Epidemiol.* 1975;3(3):115–9.
10. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(2).
11. Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* England; 1990 Feb;48(1):71–4.
12. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med oral, Patol oral y cirug??a bucal.* 2005;10 Suppl 1.
13. Barnabé W, De Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Sclaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, Streptococcus mutans and Candida albicans. *J Oral Rehabil.* 2004;31(5):453–9.
14. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS One.* 2015;10(9).
15. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2007;34(8):606–12.
16. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999;12(2):153–9.
17. Silva-Lovato CH, De Wever B, Adriaens E, Paranhos HDFO, Watanabe E, Pisani MX, et al. Clinical and antimicrobial efficacy of NitrAdine <sup>TM</sup>-based disinfecting cleaning tablets in complete denture wearers. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(6):560–5.
18. Paranhos H de FO, Silva CHL da, Venezian GC, et al. Distribution of Biofilm

- on Internal and External Surfaces of Upper Complete Dentures : the Effect of Hygiene Instruction. *Gerodontology*. 2007;24:162–8.
19. Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing--the best approach. *Br Dent J*. 1995;178(11):413–7.
20. Kawasaki K, Kamikawa Y, Sugihara K. In vitro and in vivo removal of oral *Candida* from the denture base. *Gerodontology*. 2016;33(2):247–52.
21. Nishi Y, Seto K, Kamashita Y, Kaji A, Kurono A, Nagaoka E. Survival of microorganisms on complete dentures following ultrasonic cleaning combined with immersion in peroxide-based cleanser solution. *Gerodontology*. 2014;31(3):202–9.
22. Cruz PC, Andrade IM De, Peracini A, Souza-Gugelmin MCM De, Silva-Lovato CH, Souza RF De, et al. The effectiveness of chemical denture cleansers and ultrasonic device in biofilm removal from complete dentures. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(6):668–73.
23. Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. *J Prosthet Dent*. 1984;52(2):158–63.
24. H Nikawa, T Yamamoto, T Hamada, S Sadamori SA. Cleansing Efficacy of commercial denture cleansers: Ability to Reduce *Candida albicans* biofilm Activity. *Int J Prosthodont*. 1995;8:527–34.
25. Chan EC, Iugovaz I, Siboo R, Bilyk M, Barolet R, Amsel R, et al. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. *J Can Dent Assoc*. 1991;57(12):937–9.
26. Slade GD, Akinkugbe a. a., Sanders a. E. Projections of U.S. Edentulism Prevalence Following 5 Decades of Decline. *J Dent Res [Internet]*. United States; 2014 Oct;93(10):959–65. Available from: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0022034514546165>
27. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *PLoS Med*. United States; 2010 Mar;7(3):e1000251.
28. De Andrade IM, Cruz PC, Da Silva CHL, De Souza RF, De Freitas Oliveira Paranhos H, Candido RC, et al. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and mutans streptococci in denture biofilm. *Gerodontology*. 2011;28(4):264–70.
29. Duyck J, Vandamme K, Krausch-Hofmann S, Boon L, Keersmaecker K De,

- 1 Jalon E, et al. Impact of denture cleaning method and overnight storage  
2 condition on denture biofilm mass and composition: A cross-over randomized  
3 clinical trial. PLoS One. 2016;11(1).
- 4 30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:  
5 application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods.  
6 Netherlands; 1983 Dec;65(1–2):55–63.
- 7 31. Ferreira MÁF, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-  
8 Garcia RCM, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners  
9 contaminated with Candida species. Clin Oral Investig. 2009;13(2):237–42.
- 10 32. Drake D, Wells J, Ettinger R. Efficacy of denture cleansing agents in an in  
11 vitro bacteria-yeast colonization model. Int J Prosthodont [Internet].  
12 1992;5(3):214–20. Available from:  
13 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1524643>
- 14 33. Hashiguchi M, Nishi Y, Kanie T, Ban S, Nagaoka E. Bactericidal efficacy of  
15 glycine-type amphoteric surfactant as a denture cleaner and its influence on  
16 properties of denture base resins. Dent Mater J. 2009;28(3):307–14.
- 17 34. Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. J Prosthet  
18 Dent. 1979;42(6):619–23.
- 19 35. Palenik CJ, Miller CH. In vitro testing of three denture-cleaning systems. J  
20 Prosthet Dent. 1984;51(6):751–4.
- 21 36. Shay K. Denture Hygiene: A Review and Update. J Contemp Dent Pract  
22 Winter Issue J Contemp Dent Pract [Internet]. 2000;1(2). Available from:  
23 [http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=1436&Type=](http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=1436&Type=FREE&TYP=TOP&IN=~eJournals/images/JPLOGO.gif&IID=122&isPD...)  
24 [FREE&TYP=TOP&IN=~eJournals/images/JPLOGO.gif&IID=122&isPD...](http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=1436&Type=FREE&TYP=TOP&IN=~eJournals/images/JPLOGO.gif&IID=122&isPD...)
- 25 37. Landa AS, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC, Busscher HJ. Recalcitrance  
26 of Streptococcus mutans biofilms towards detergent-stimulated detachment.  
27 Eur J Oral Sci. 1999;107(4):236–43.
- 28 38. Salles AES, Macedo LD, Fernandes RAG, Silva-Lovato CH, Paranhos H de  
29 FO. Comparative analysis of biofilm levels in complete upper and lower  
30 dentures after brushing associated with specific denture paste and neutral  
31 soap. Gerodontology. 2007;24(4):217–23.
- 32 39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:  
33 Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods.  
34 Netherlands; 1983 Dec;65(1–2):55–63.

- 1 40. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay.  
2 Methods Mol Biol. United States; 2011;731:237–45.
- 3 41. Brambilla E, Gagliani M, Ionescu A, Fadini L, García-Godoy F. The influence  
4 of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces.  
5 Dent Mater. England; 2009 Sep;25(9):1067–72.
- 6 42. De Souza RF, De Freitas Oliveira Paranhos H, Lovato Da Silva CH, Abu-  
7 Naba'a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. Interventions for cleaning dentures in  
8 adults. Cochrane Database Syst Rev. 2009;(4):CD007395.
- 9 43. Paranhos H de FO, Silva CHL da. Comparative study of methods for the  
10 quantification of biofilm on complete dentures. Braz Oral Res [Internet].  
11 2004;18(3):215–23. Available from:  
12 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242004000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)  
13 [83242004000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242004000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- 14 44. Campos MS, Marchini L, Bernardes LAS, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm  
15 microbial communities of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol.  
16 2008;23(5):419–24.
- 17 45. Morino T, Ookawa K, Haruta N, Hagiwara Y, Seki M. Effects of professional  
18 oral health care on elderly: Randomized trial. Int J Dent Hyg. 2014;12(4):291–  
19 7.

## **ARTIGO EM INGLÊS**

### **Randomized cross-over study of ultrasound on complete dentures in institutionalized patients.**

Ana Paula Sponchiado

Curso de Odontologia, Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil.

Herbert Koch Filho

Curso de Odontologia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Rosimeire Takaki Rosa

Curso de Farmácia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Programa de pós-graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Rodrigo Nunes Rached

Programa de pós-graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

## **CORRESPONDING AUTHOR**

Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached

PUCPR (PPGO)

Rua Imaculada Conceição, 1155. Curitiba, PR, Brazil, 80215-901.

Phone: 55 41 3271-1637

E-mail: r.rached@pucpr.br; ronura@gmail.com

## Abstract

**Introduction:** The elaboration of a practical and efficient protocol for the cleaning of complete dentures in long-term care institutions (LTCIs) for the elderly is extremely important for the prevention of prosthetic stomatitis and related systemic diseases. **Objective:** To compare the efficacy of the ultrasound bath and the traditional brushing in the cleaning of complete dentures of patients admitted in LTCIs. **Materials and Methods:** A randomized crossover clinical study was conducted with 17 elderly users of complete dentures of institutionalized elderly. The cleaning protocols were brushing and ultrasonic bath, both applied with liquid neutral detergent. Biofilm biomass was estimated by the reduction test of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and the specific microbiological load (CFU) for *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Candida* spp. was quantified by selective and differential culture. The statistical tests used were Mann-Whitney U test and Wilcoxon signed test ( $\alpha = 5\%$ ). **Results:** Only the ultrasound method statistically reduced the baseline for treatment to biofilm biomass (MTT). The counts of *Streptococcus* spp. were reduced by the two methods of hygiene. However, *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. were only reduced by the ultrasound method. **Conclusions:** The ultrasonic bath proved to be a viable alternative method for the mechanical cleaning of complete dentures in LTCIs.

**Keywords:** Complete dentures. Biofilm. Long term care institution. Ultrasound bath. Brushing.

## 1    **Introduction**

2            Users of complete dentures admitted to long-term care institutions (LTCIs)  
3    may be unable to maintain hygiene of their dentures (1-3) because of illness,  
4    dementia, or poor motor coordination, making them dependent on caregiver support  
5    (4). Although these professionals consider oral hygiene to be important, some  
6    barriers make it difficult to perform oral hygiene in institutionalized patients, because  
7    of as patient refusal behavior, lack of time and work overload (5).

8            The systemic spread of microorganisms from oral infections associated with  
9    biofilm accumulation in complete dentures may lead to systemic conditions of great  
10   concern, such as infective endocarditis, aspiration pneumonia and chronic  
11   obstructive pulmonary disease, especially in elderly dependent patients (6-8). Thus,  
12   it is clear that the hygiene of the complete prostheses for biofilm control is vital to  
13   reduce the risk of such diseases (7).

14           Oral candidiasis, in the form of prosthetic stomatitis, affects approximately  
15   65% of patients who use complete dentures and is generally associated with poor  
16   oral hygiene (11). The condition can be aggravated by trauma, continuous use of  
17   the prosthesis, allergic reaction to the material of the prosthesis and its cleaning  
18   products, hyposalivation, inadequate diet and use of antibiotics (12,13). *Candida*  
19   *albicans* is the main etiological agent of the condition, together with other  
20   pathogenic and opportunistic microorganisms, such as *Streptococcus* spp.,  
21   *Staphylococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. (14-16).

22           Cleaning of complete dentures can be carried out chemical agents  
23   (hypochlorite, peroxide, enzyme, mouthwashes) and physical methods (brushing,  
24   sonic and ultrasonic vibration) (9,10). Chemical disinfection is more effective when  
25   associated with a mechanical control of the biofilm on the prostheses surface  
26   (21,22). Brushing with or without soap, toothpaste or abrasives is the most  
27   commonly reported method for cleaning complete dentures (7,10,17). Ultrasound  
28   bathing has been shown to be a viable method of cleaning, especially for cognitively  
29   impaired and physically impaired inmates (18-20). It is suggested that this method  
30   be associated to a cleaning solution that is effective in the removal of biofilm,  
31   besides being easy to access and low cost (17). An ideal cleaning agent for  
32   complete dentures should remove organic and inorganic matter, be non-toxic, be  
33   inexpensive and easy to handle, and reduce biofilm (21).

1 A considerable variety of chemicals for cleaning dentures is available  
2 (23,24). However, the difficulty of acquisition and correct handling limits its adoption  
3 in LTCIs (20). The use of ordinary cleansers is an option to consider given its ease  
4 of acquisition and effectiveness in meeting the needs of patients with complete  
5 dentures (25).

6 The main objective of the present study was to evaluate the efficacy of the  
7 ultrasound bath in the cleaning of complete dentures of patients hospitalized in  
8 LTCIs compared to traditional brushing. The specific objective was to determine the  
9 efficacy of the hygiene methods (brushing and ultrasound) from the biofilm biomass  
10 and the cell estimation by basal area of the complete denture before and after the  
11 application of the same. The null hypotheses of the study were that: 1) There will  
12 be no difference between the two methods of cleaning of the complete dentures for  
13 the biofilm biomass variable; 2) There will be no difference between the two  
14 methods of hygiene of complete dentures for the specific microbial load; 3) There  
15 will be no difference between baseline and treatment for the all variables studied.

## 16 **Materials and methods**

17 The present study was registered in the REBEC (RBR-3jj84f) and approved  
18 by the Institutional Ethics Committee (Protocol number 2,225,015).

### 19 *Sample selection*

20  
21 The sample consisted of individuals selected from the residents of two LTCIs  
22 located in the metropolitan region of the city of Curitiba (Paraná, Brazil). The  
23 principal investigator previously evaluated the complete dentures of the  
24 institutionalized individuals. Inclusion criteria were 60 years of age or older, fully  
25 dependent, complete edentulism, and use of a conventional upper complete  
26 denture in acrylic resin for at least one year. Exclusion criteria were use of  
27 conventional fractured, repaired or relapsed upper complete dentures, being in use  
28 or having used antibiotics, antifungals or steroids for a period of three months prior  
29 to the survey, using denture adhesives, being a smoker, have prosthetic stomatitis  
30 and complete dentures with accumulation of calculus.

31 A sample size calculation for a non-inferiority trial with no difference between  
32 one treatment (ultrasound) for another (brushing) indicated a sample size of 13  
33 patients for a power of 80% (26).  
34

The CONSORT flowchart (27) is presented in Figure 1. The institutions and their interns were invited to participate in the research after presenting the risks, benefits and objectives of the present study. The final sample consisted of 17 individuals (4 men and 13 women) with a mean age of 72.5 years (range 62-86 years). The legally responsible person was contacted and clarifications were made on the research and they signed the informed consent form.

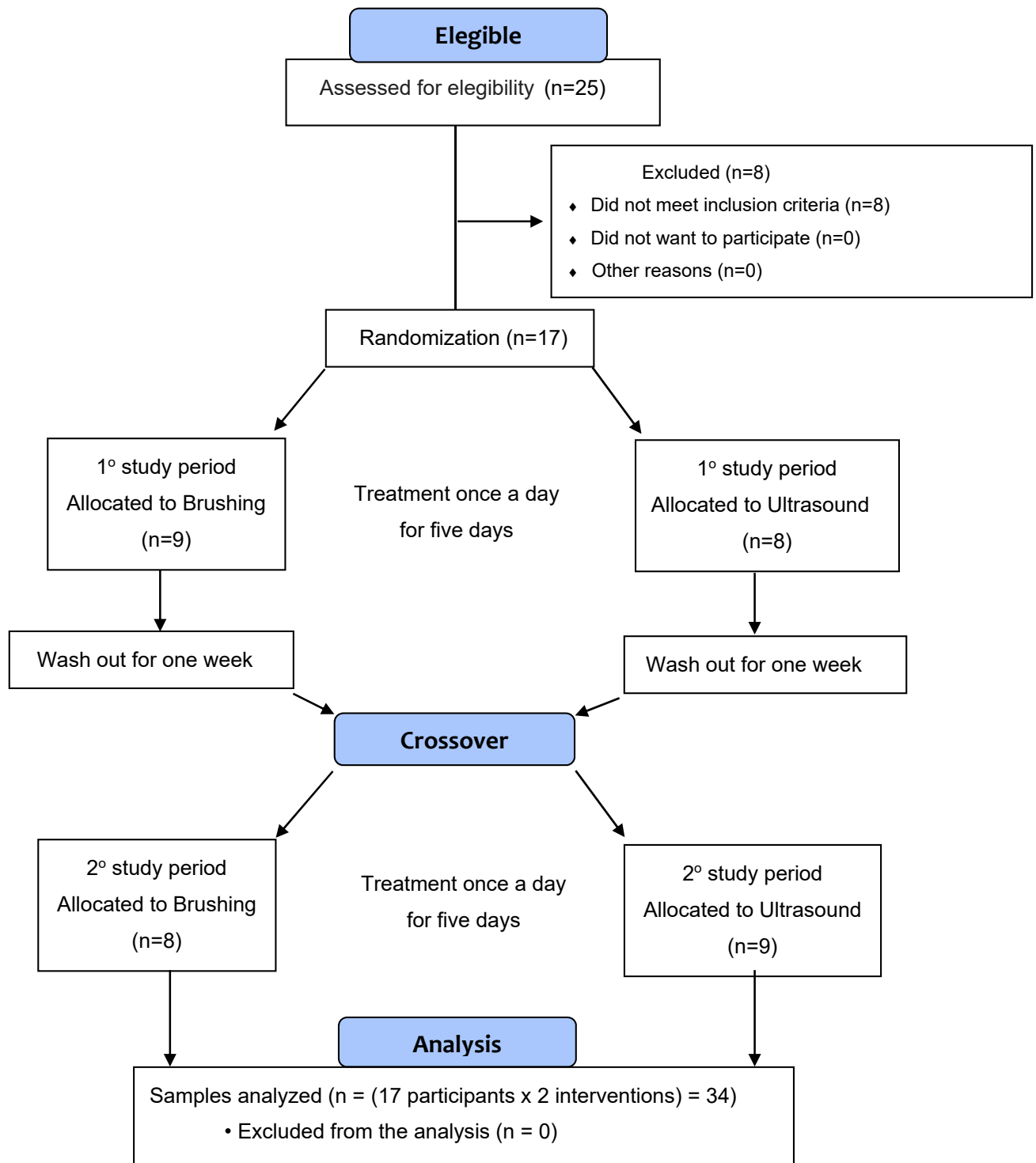


Figure 1. CONSORT Fluxogram.

1    *Study design and methods of complete denture cleaning*

2            This study is a cross-sectional, randomized, double-blind trial. All of the  
3    complete dentures were exposed to the two interventions, for five days each.

4            Manual brushing with neutral detergent: Brushing once a day at a fixed  
5    time for two minutes (20) for five days, using a soft denture cleaning brush  
6    (Twister, Colgate, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil) with neutral  
7    detergent without glycerin (Ypê, Goiânia, Goiás, Brazil).

8            Ultrasonic bath with neutral detergent solution: Immersion once a day at  
9    a fixed time for 15 minutes for five days in a solution containing 100 mL of water  
10   and one drop of neutral dishwashing detergent (Ypê, Goiânia, Goiás, Brazil).  
11   The prostheses were individually inserted into identified and capped glass  
12   recipients containing 100ml of tap water, which were subjected to ultrasonic  
13   vibration (Cristofoli, Campo Mourão, Paraná, Brazil) at 160 watts once daily at  
14   a fixed time for 15 minutes (19,28) for five days. The complete dentures were  
15   then rinsed in tap water and returned to the participant.

16           The randomization was done by lottery by one of the researchers (R.N.R.)  
17   using cards that contained the methods to be searched. During the experimental  
18   phase, a poster was fixed with the sequence of randomized hygiene of the  
19   prostheses of each individual and a daily checklist in the bed of each patient.  
20   On the walls of the bathrooms, posters were fixed so that the hygiene of the  
21   complete dentures was not performed by anyone other than the previously  
22   trained caregiver.

23           Before the beginning of the research, the upper complete dentures of  
24   each participant were molded in alginate (Jeltrate, Dentsply, Petrópolis, Rio de  
25   Janeiro, Brazil) (Figure 2) and replicated in opaque acrylic resin (Jet, Clássico,  
26   Campo Limpo Paulista, São Paulo, Brazil) (Figure 3). The replicas were  
27   scanned by a dental scanner (Ceramill map400, Amann Girrbach, Koblach,  
28   Austria) (Figure 4) and the images obtained were analyzed using the Solid Edge  
29   program v.20 (Siemens PLM, Plano, USA, 2007) (Figure 5) to calculate the total  
30   area of the prosthesis (cm<sup>2</sup>).

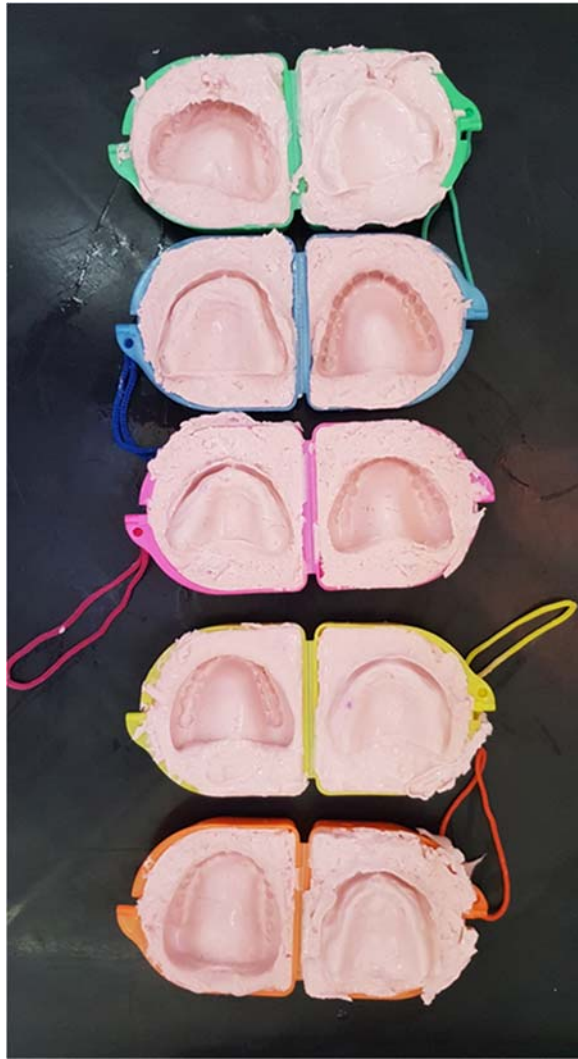


Figure 2: Denture molds



Figure 3: Denture replica painted for scanning



Figure 4: Dental scanner (Ceramill map400, Amann Girrbach, Koblach, Austria)

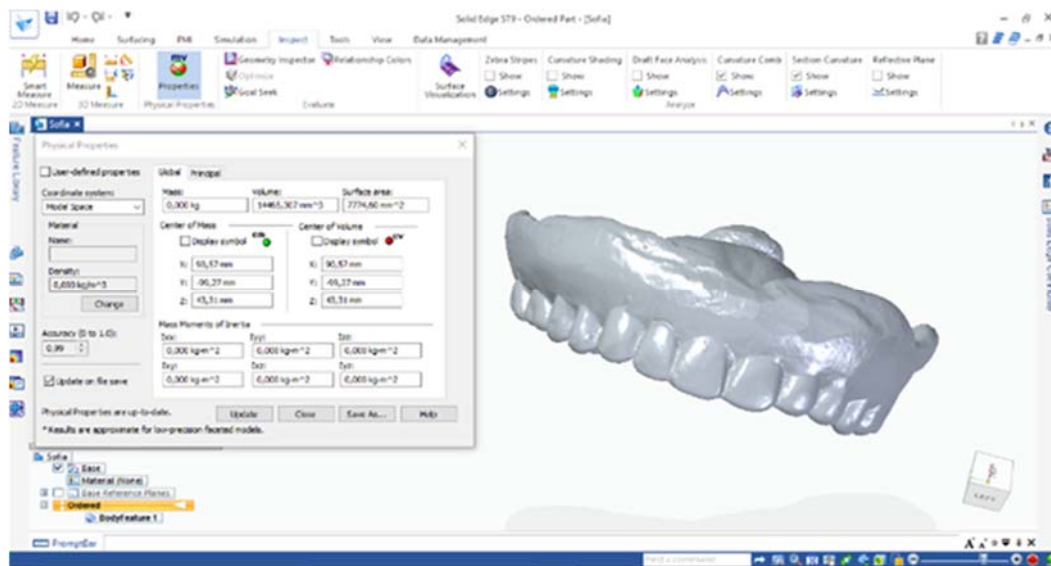


Figure 5: Solid Edge Program v.20 (Siemens PLM, Plano, USA, 2007)

1

2 In order to standardize the baseline cleaning for all complete dentures,  
 3 they were immersed in vinegar (4.2% acetic acid) for 10 minutes (Figure 6) and  
 4 then brushed with 2% chlorhexidine digluconate paste (Maquira, Maringá,  
 5 Paraná, Brazil) for two minutes (29) (Figure 7).  
 6 If the patient had a lower complete denture, it also went through the process

1 described for the total upper complete denture. The prostheses were washed  
2 with running water and delivered to participants. They used the prostheses  
3 normally for two days (29). Then and they were cleaned by brushing once daily  
4 with soap and water, as was the constancy of long-term care institutions.



Figure 6: Prosthesis immersed in 4.2% acetic acid solution



Figure 7: Prostheses brushed with chlorhexidine digluconate paste 2%

5 After that period, possible dietary residues were eliminated from an  
6 indirect swirl of tap water into a plastic pot of 500 mL volume containing a  
7 prosthesis every 30 seconds (Figure 8). Subsequently, the complete denture  
8 were immersed 100 mL of sterile saline solution (Figure 9). The assemblies  
9 were taken to the ultrasonic bath for 15 minutes (Figure 10) and the suspensions  
10 obtained were considered baseline in the microbiological analyzes.



Figure 8: Indirect water swirl to eliminate possible debris from dentures



Figure 10: Dentures immersed in physiological saline being sonicated for 15 minutes

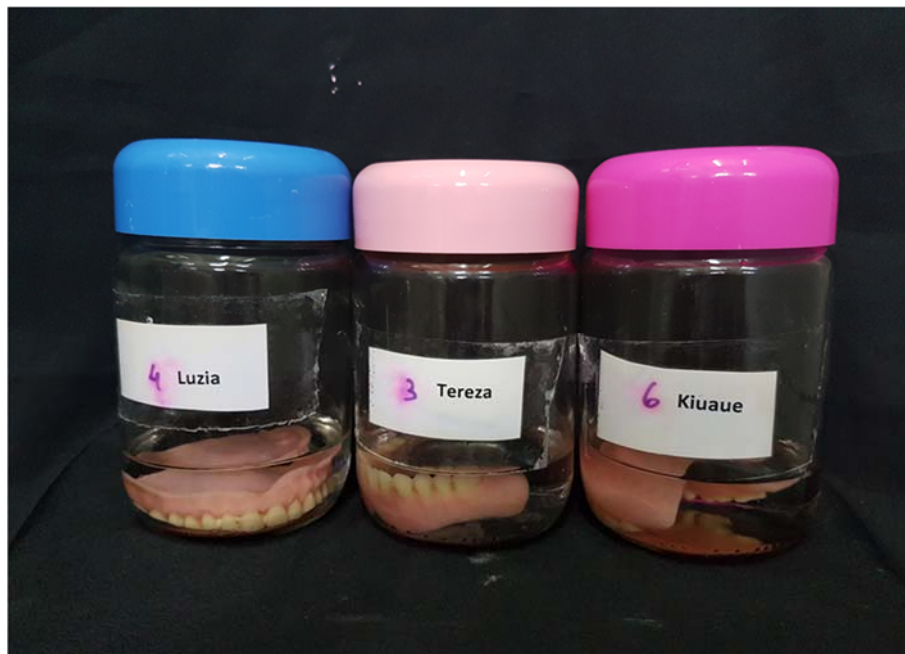


Figure 9: Dentures immersed in 100 mL of saline solution

1

2

3 After this collection, the prostheses were again disinfected by immersion in  
 4 0.12% chlorhexidine digluconate (Colgate, São Bernardo do Campo, São Paulo,  
 5 Braasil) for 15 minutes (Figure 11), followed by brushing with 2% chlorhexidine gel  
 6 (Maquira, Maringá, Paraná, Brasil) for 2 minutes (Figure 12) and returned to the  
 7 participants, which were exposed to the experimental treatments.



Figure 11: Immersion prosthesis in 0.12% chlorhexidine digluconate for 15 minutes.



Figure 12: Prostheses brushed with chlorhexidine gel 2% for 2 minutes.

1

2 Each of the methods of hygiene, brushing (Figure 13) and ultrasound (Figure  
3 14), was conducted for five consecutive days.



Figure 13: Prostheses submitted to the brushing method



Figure 14: Prostheses submitted to the ultrasound method

4

5 After the application of each of the techniques, the prostheses were kept  
6 in sterilized vials identified containing 100 mL of saline solution (Figure 15). The  
7 sets were taken to the ultrasonic bath for 15 minutes (Figure 16) and the

1 suspensions obtained were considered "treatments" in the microbiological  
2 analyzes.

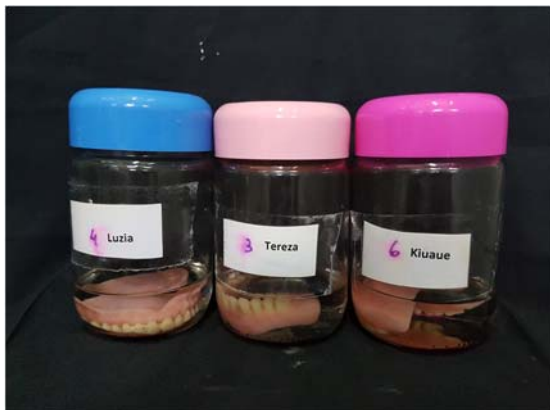


Figure 15: Prostheses immersed in 100 ml of saline solution.



Figure 16: Prostheses immersed in saline being sonicated for 15 minutes

3  
4 Following this, a one week washout period was performed, in which the  
5 complete dentures were brushed once daily with soap, as was the practice of LTCIs.  
6 After the wash out, the prostheses were again disinfected by immersion in  
7 chlorhexidine digluconate 0.12% digluconate (Colgate, São Bernardo do Campo,  
8 São Paulo, Braasil) for 15 minutes and brushing with 2% chlorhexidine gel  
9 (Maquira, Maringá, Paraná, Brasil) for 2 minutes and returned to the participants.  
10 The crossing then occurred and the methods were reapplied as described above.

11 The "baseline" and "treatment" suspensions were again sonicated in  
12 ultrasonic bath (model 2840D, Odontobrás, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil)  
13 (Figure 17) for 20 minutes for maximum biofilm inhibition.



Figure 17: Ultrasonic bath, 2840D (Odontobrás, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil)

Aliquots of 500  $\mu\text{L}$  were collected for quantification of specific microbial load. The remainder was used for biomass estimation by the reduction test of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) (30) (Figure 18).

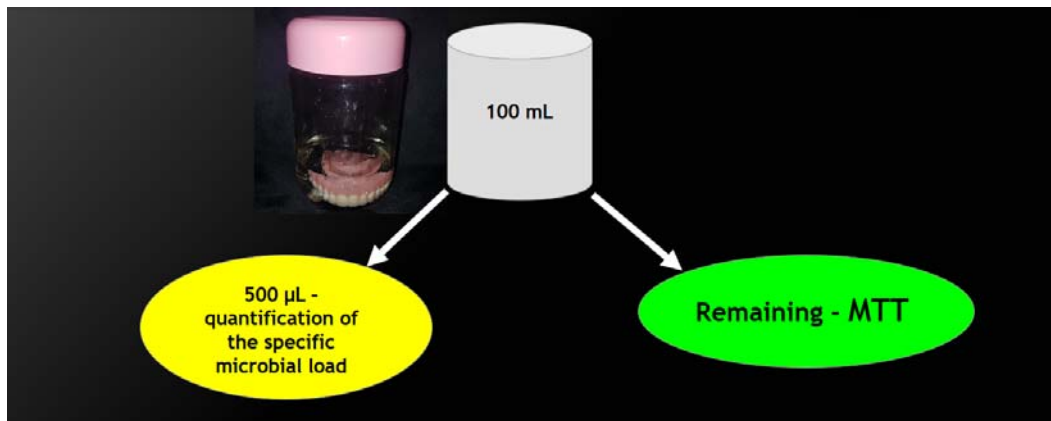


Figure 18: Initial Dilution Scheme

#### *Quantification of the specific microbial load*

The dilution protocol was then determined after a pilot study with a complete denture from one participant. Aliquots of 500  $\mu\text{L}$  of the suspensions were combined with 500  $\mu\text{L}$  of distilled water and vortexed (model AP56, Phoenix, Araraquara, Sao Paulo, Brazil) at 1500 RPM for 30 seconds. Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  were taken combined with 900  $\mu\text{L}$  of distilled water and vortexed at 1500 RPM for 30 seconds (Figure 19).

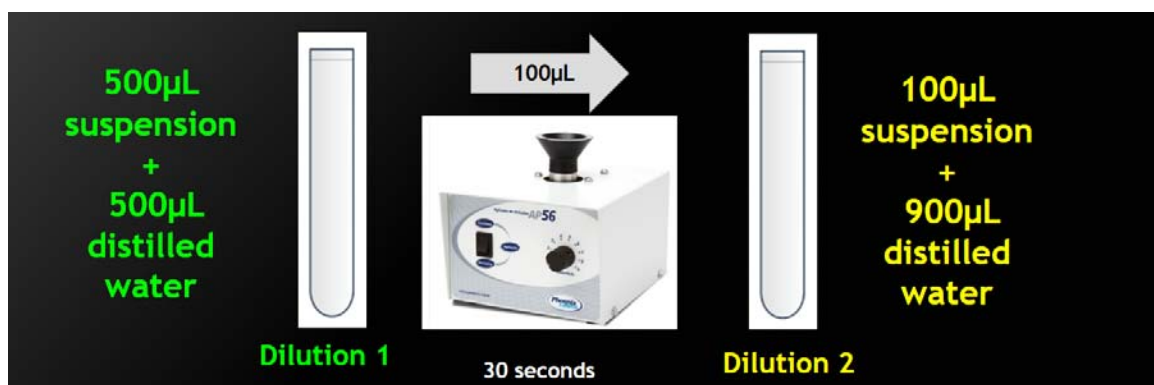


Figure 19: Dilution scheme

Aliquots of 100 µl from the above diluted suspensions were plated in selective and differential culture media Chromocult (Merck, Germany), Manitol Salgado Agar (NewProv, Pinhais, Brazil) and Sabouraud Agar Dextrose (NewProv, Pinhais, Brazil) (Figure 20). These media allow the presumptive quantification of *Streptococcus* spp. (after confirmation by Gram), *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp., respectively. Plates containing media for quantification of bacteria were incubated at 37 ° C (Orion-502, Fanem, São Paulo, Brazil) and plates with yeast media were incubated at 28 ° C. Incubations were conducted for 72 hours in a normoxic atmosphere.

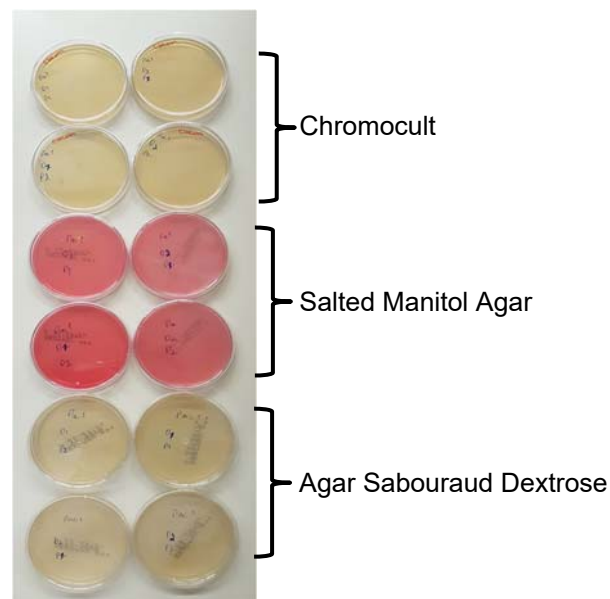


Figure 20: Selective and differential inoculated culture media

After the incubation times, the specific microbial load of the prostheses was determined by counting the number of colonies grown with genotype indicative phenotypes (CFU = colony forming units), followed by correction with dilution factors. The specific microbial density was obtained by dividing the numerical values of the CFU by the areas of the prostheses (cm<sup>2</sup>).

# 1 *Estimation of biofilm biomass by MTT reduction assay*

2       Sonicated suspensions were centrifuged at  $4500 \times g$  (BE-4004, Bioeng,  
3 Curitiba) for 10 minutes. The supernatant was removed and 1.5 mL of sterile water  
4 was added (Figure 21). After resuspension and transfer to microtubes, the  
5 suspensions were centrifuged at  $10,000 \times g$  (Eppendorf, Hamburg, Germany) for  
6 one minute. After removal of the supernatant, 500  $\mu\text{L}$  of 1 mg / mL MTT was added  
7 and the microtubes incubated at  $37^\circ \text{C}$  for three hours. At each hour, the microtubes  
8 were vortexed at 1500 RPM, for 30 seconds (Figure 22). At the end of the  
9 incubation, 500  $\mu\text{L}$  of distilled water was added to the microtubes, which were  
10 agitated and centrifuged again for three minutes. The supernatant was removed  
11 and 200  $\mu\text{L}$  of isopropyl alcohol was added to the pellets. After stirring for 30  
12 seconds, the content was separated at  $10,000 \times g$  for one minute (Figure 23).  
13 Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  of the supernatants were collected and transferred to wells of flat  
14 bottom reading plates. The optical densities of the formed formazan were measured  
15 in TP-Reader (Thermoplate) at 540 nm. The values of optical density were divided  
16 by the areas of the respective prostheses. Final results were expressed as OD540  
17 /  $\text{cm}^2$  (Figure 24).



Figure 21: Schematic of the initial centrifugation

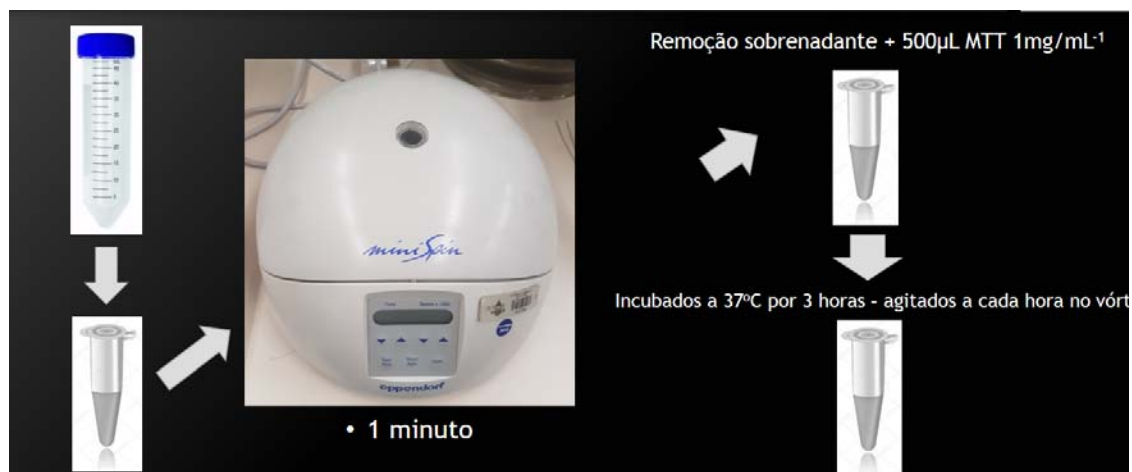


Figure 22: Schematic of the second centrifugation and addition of MTT



Figure 23: Schematic of the preparation for the MTT test

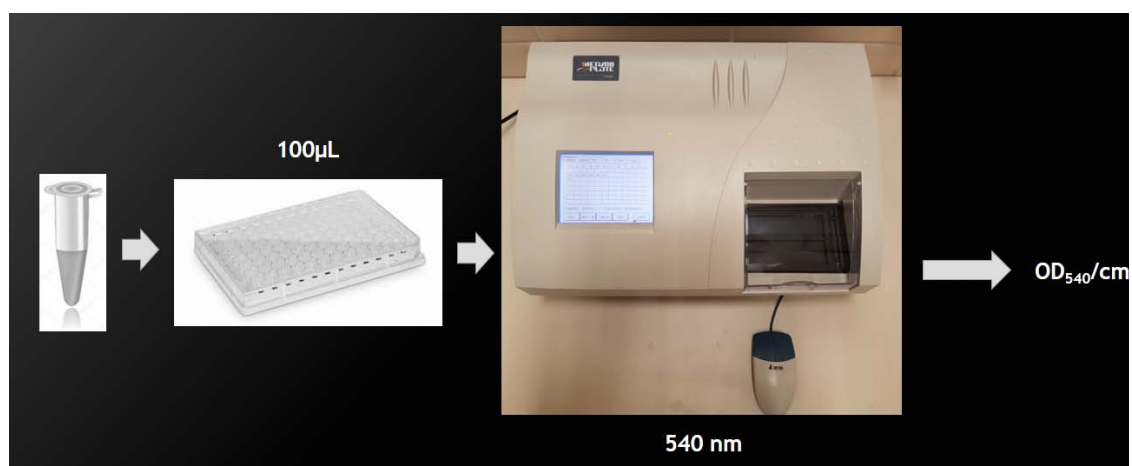


Figure 24: Schematic depicting MTT test reading

Both the quantification of the specific microbial load and the biomass estimation by the MTT reduction assay were conducted by a blinded investigator (A.P.S.) in relation to the experimental treatments conducted.

### Statistical analysis

The analyzes were conducted with the Statistical Package for Social Science 24.0 (SPSS Inc). The results were analyzed for normality by the Kolmogorov-Smirnov tests with correlation of significance of Lilliefors and Shapiro-Wilk. The pooled comparisons according to the "cleaning method" were made by the Mann-Whitney U-test. The analysis of effects between groups was performed by the Kruskal-Wallis test, and the post-hoc comparison between groups was analysed by the Dunn test. The comparisons between "baseline" and "treatment" were made by Wilcoxon signed test. All tests were conducted with a significance level of 5%.

### Results

The Mann-Whitney test revealed a significant difference between the cleaning methods for baseline biofilm biomass variation ( $p < 0.05$ ). The Wilcoxon test showed that only the ultrasound cleaning method statistically reduced baseline biofilm biomass values for treatment ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

Table 1 - Means and standard deviations for biofilm mass (expressed as OD540 / cm<sup>2</sup>) by microorganisms, according to baseline and treatment methods.

|                   | Baseline         | Treatment        |           |
|-------------------|------------------|------------------|-----------|
| <b>Brushing</b>   | 21.43 (25.27) Aa | 16.27 (17.91) Aa | $p=0.084$ |
| <b>Ultrasound</b> | 31.96 (17.89) Ba | 9.42 (8.89) Ab   | $p=0.000$ |
|                   | $p=0.024$        | $p=0.209$        |           |

Uppercase letters in the lines compare methods. Lowercase letters in columns compare baseline and treatment.

The comparison between the brushing and ultrasound methods (Mann-Whitney U test) before and after the cleaning methods (Wilcoxon test) for specific loading of *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. and are shown in Table 2. Brushing and ultrasound showed different counts for *Streptococcus* spp. in the baseline ( $p < 0.05$ ). Differences before and after the

methods were detected for brushing in the *Streptococcus* spp. and for ultrasound in all microorganisms.

Table 2. Means and standard deviation for specific loading of microorganisms *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. (log10-CFU/cm<sup>2</sup>) according to the methods of hygiene and institution.

|                            | Cleaning method   | Baseline       | Treatment                |
|----------------------------|-------------------|----------------|--------------------------|
| <i>Streptococcus</i> spp.  | <b>Brushing</b>   | 2.49 (1.15) Aa | 1.82 (1.42) Ab $p=0.003$ |
|                            | <b>Ultrasound</b> | 3.18 (0.71) Ba | 1.82 (1.29) Ab $p=0.000$ |
|                            |                   | $p=0.002$      | $p=0.911$                |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | <b>Brushing</b>   | 1.52 (1.30) Aa | 1.25 (1.17) Aa $p=0.186$ |
|                            | <b>Ultrasound</b> | 1.81 (1.28) Aa | 1.02 (1.16) Ab $p=0.000$ |
|                            |                   | $p=0.287$      | $p=0.452$                |
| <i>Candida</i> spp.        | <b>Brushing</b>   | 2.26 (1.60) Aa | 2.08 (1.44) Aa $p=0.136$ |
|                            | <b>Ultrasound</b> | 2.39 (1.46) Aa | 1.82 (1.54) Ab $p=0.000$ |
|                            |                   | $p=0.834$      | $p=0.524$                |

Capital letters in the lines compare methods for each microorganism. Lower case letters in the columns compare baseline and treatment for each cleaning method and microorganism.

## Discussion

On the present study, ultrasound significantly reduced the biofilm biomass level, from baseline to treatment, rejecting the first null hypothesis. In methods of quantification of specific microbial load, both brushing and ultrasound were able to reduce *Streptococcus* spp., but only the ultrasound was able to reduce *Candida* spp. and *Staphylococcus* spp., rejecting the second null hypothesis. As there were differences between baseline and treatment, the third null hypothesis was also rejected.

The cleansing method of the complete denture with 4.2% acetic acid and chlorhexidine two days before the baseline collection (29) had the objective of normalizing the microbial load of the same. Despite this, the brushing group differed from the ultrasound group in the baseline for biofilm biomass and for *Streptococcus* spp. However, there are no universal standards of normal biomass values for dental biofilms in complete dentures, whereas for *Streptococcus* spp., The differences between the mean values of cell loading (maximum difference of 1.35 log10) should represent normal salivary, saliva buffer capacity, prosthesis roughness, individual microbiota) of counts among different subjects.

Regarding biofilm biomass, at the end of the experimental phase, there were no differences between brushing and ultrasound, which is in agreement with the literature (20,29). However, when comparing the biomass reduction capacity from the baseline to the treatment, only ultrasound has this capability. Some studies also show greater effectiveness of the ultrasound, but when it is associated with effervescent tablets (19,20). After treatment, both methods either maintained baseline levels for biofilm biomass (reportedly reduced by prior chlorhexidine immersion prior to the experiment) or reduced those levels with statistical significance.

Regarding the effect of cleaning methods on the count of microorganisms *Streptococcus* spp. were those that presented a statistically significant reduction of baseline and treatment scores. This reduction also occurred in the study by Andrade IM et al (28) (2011), but in this study they used ultrasound immersion associated with effervescent tablets. The counts of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. were reduced only in the ultrasound method. Nishi Y et al (19) (2014) also report a decrease in *Candida* spp. with the use of ultrasound, but there is an association with effervescent tablets. However, for Duyck et al (29) (2016) and Andrade IM et al (28) (2011) there was no reduction of *Candida* spp. nor in the brushing or ultrasound groups associated with effervescent tablets or not. It is important to mention that in the present study the levels of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. after treatment did not increase in any group, they only maintained baseline levels.

Ubiquitous microorganisms, such as *Candida* spp., Occur in both healthy and prosthetic stomatitis participants. Particularly, *Candida albicans* is found in prostheses of participants presenting pathological alterations (11,16). Studies have reported the difficulty in reducing the levels of this fungus, an important etiological factor of prosthetic stomatitis, in the multi-species biofilm of the complete dentures, even when mechanical hygienization techniques are associated with effervescent tablets (28,31,32).

It has been suggested that *Streptococcus* spp from complete dentures biofilm creates a glucan barrier that could limit the exposure of other species, including *Candida* spp., To chemical cleaning methods (32). The largest reductions in *Candida* spp. were found when bactericidal and / or fungicidal

solutions were associated with ultrasound (33). Based on these premises, it is possible to assume that an association could be effective, since cleaning with the ultrasound is capable of destabilizing the superficial layers of the biofilm of the denture, which contains glucans produced by *Streptococcus* spp. This disruption would expose *Candida* spp. which are found in the deeper layers of the biofilm, to the action of chemicals (32-34).

*Staphylococcus* spp. are linked to pneumonia that affects many elderly residents of ILPIs (6) and in the present study only the ultrasound method was able to significantly reduce the concentration of these microorganisms in the total dentures.

Studies evaluating the cleaning methods adopted by users of complete dentures indicate brushing and the use of water and toothpaste as the most common used method (7,10,17). The advantage of ultrasound versus brushing is that many geriatric participants who use full dentures have motor difficulties to brush their dentures (19). Ultrasonic cleaning of prostheses is not a commonly used technique for cleaning denture in LTCIs, probably due to lack of information from caregivers and inmates. However, this cleaning modality can be effective in an institutional environment that provides care for the elderly with physical or cognitive deficits (19,35,36). The adoption of the ultrasound bath by LTCIs is justified because it is a technique whose effectiveness is not very sensitive to the amount of caregivers responsible for the hygiene of complete dentures, different from that observed with the brushing method. Although the use of ultrasound requires the training of caregivers of the elderly, its easy operation does not discourage its use. Other advantages of the ultrasound bath include the reduction of the risk of occupational infection (by reducing the contact of the caregivers with the prostheses). The effectiveness of the method and the possibility of cleansing more than one prosthesis at the same time.

The use of household detergent as a cleaning method is justified by its proven emulsifying action, which degrades biofilms. Besides, ultrasonic cleaning is more effective in the presence of a chemical agent with such characteristics (21,28). In addition, the detergent solubilizes proteins and consequently reduces the microbial adhesion on the surface of the complete dentures (23,37). Its

advantage over tablets is centered on non-abrasiveness, low cost and ease of access (38).

The choice of biofilm biomass estimation for the MTT reduction test was shown to be correct, since it is a widely used method in several areas (39,40) and is applicable for quantification of microbial contents on dental materials (41). The method of post-retention differential dye retention by biofilm, although frequently cited in the literature (20,22,42,43), is limited and not precise (29). The Polymerase Chain Reaction (PCR) is another widely used test for biofilm evaluation of complete dentures (29,44,45); but does not discriminate living cells from dead cells, since it is based on the indistinct amplification of DNA segments, which may contribute to a mis-estimate of the microbial load (29). In turn, the estimation of microbial biomass by the quantification of formazana formed in the reduction of MTT is more reliable in estimating the load of living cells (40).

## Conclusion

After treatment, only the ultrasound method was able to significantly reduce biofilm biomass values and the counts of *Candida* spp., *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. Thus, the ultrasonic bath proved to be a viable alternative method for the mechanical cleaning of complete dentures in LTCIs.

## Acknowledgment

The authors would like to thank the elderly people who live in the two long-term care institutions and their families who collaborated and supported the project. They also would like to thank the caregivers and all the employees of these institutions, with special thanks to the caregiver Eva Alice Cavalli, who worked effectively during the experimental phase.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

## References

1. De Visschere L, de Baat C, Schols JMGA, Deschepper E, Vanobbergen J. Evaluation of the implementation of an 'oral hygiene protocol' in nursing homes: a 5-year longitudinal study. *Community Dent Oral Epidemiol*. Blackwell Publishing Ltd; 2011 Oct;39(5):416–25.
2. Zenthöfer A, Dieke R, Dieke A, Wege K-C, Rammelsberg P, Hassel AJ. Improving oral hygiene in the long-term care of the elderly-a RCT. *Community Dent Oral Epidemiol* [Internet]. 2013;41(3):261–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020631> <http://doi.wiley.com/10.1111/cdoe.12007>
3. Gil-Montoya JA, de Mello ALF, Cardenas CB, Lopez IG. Oral Health Protocol for the Dependent Institutionalized Elderly. *Geriatr Nurs (Minneap)*. 2006;27(2):95–101.
4. Paradisi I, Landaverde G, Malo A-M, Velly AM. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. *J Can Dent Assoc*. 2002 Jan;68(1):39–45.
5. Gibney J, Wright C, Sharma A, Naganathan V. Nurses' knowledge, attitudes, and current practice of daily oral hygiene care to patients on acute aged care wards in two Australian hospitals. *Spec Care Dent*. 2015;35(6):285–93.
6. Mylotte JM. Nursing Home-Associated Pneumonia. Vol. 23, *Clinics in Geriatric Medicine*. 2007. p. 553–65.
7. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. Vol. 64, *British Journal of Biomedical Science*. 2007. p. 180–9.
8. Scannapieco FA, Shay K. Oral health disparities in older adults: Oral bacteria, inflammation, and aspiration pneumonia. *Dent Clin North Am*. 2014;58(4):771–82.
9. Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1975;3(3):115–9.
10. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2).
11. Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*.

- 1 England; 1990 Feb;48(1):71–4.
- 2 12. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios  
3 B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus*  
4 *aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental  
5 prosthesis. *Med oral, Patol oral y cirug??a bucal*. 2005;10 Suppl 1.
- 6 13. Barnabé W, De Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Sclaro JM.  
7 Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents  
8 in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida*  
9 *albicans*. *J Oral Rehabil*. 2004;31(5):453–9.
- 10 14. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The  
11 oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural  
12 dentition. *PLoS One*. 2015;10(9).
- 13 15. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini  
14 A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm  
15 accumulation. *J Oral Rehabil*. 2007;34(8):606–12.
- 16 16. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in  
17 vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont*.  
18 1999;12(2):153–9.
- 19 17. Silva-Lovato CH, De Wever B, Adriaens E, Paranhos HDFO, Watanabe E,  
20 Pisani MX, et al. Clinical and antimicrobial efficacy of NitrAdine <sup>TM</sup>-based  
21 disinfecting cleaning tablets in complete denture wearers. *J Appl Oral Sci*.  
22 2010;18(6):560–5.
- 23 18. Paranhos H de FO, Silva CHL da, Venezian GC, et al. Distribution of Biofilm  
24 on Internal and External Surfaces of Upper Complete Dentures : the Effect of  
25 Hygiene Instruction. *Gerodontology*. 2007;24:162–8.
- 26 19. Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing--the best approach. *Br Dent J*.  
27 1995;178(11):413–7.
- 28 20. Kawasaki K, Kamikawa Y, Sugihara K. In vitro and in vivo removal of oral  
29 *Candida* from the denture base. *Gerodontology*. 2016;33(2):247–52.
- 30 21. Nishi Y, Seto K, Kamashita Y, Kaji A, Kurono A, Nagaoka E. Survival of  
31 microorganisms on complete dentures following ultrasonic cleaning  
32 combined with immersion in peroxide-based cleanser solution.  
33 *Gerodontology*. 2014;31(3):202–9.
- 34 22. Cruz PC, Andrade IM De, Peracini A, Souza-Gugelmin MCM De, Silva-

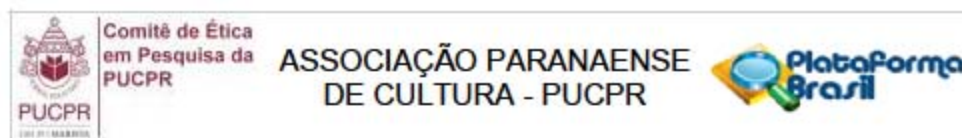
- 1 Lovato CH, Souza RF De, et al. The effectiveness of chemical denture  
2 cleansers and ultrasonic device in biofilm removal from complete dentures. J  
3 Appl Oral Sci. 2011;19(6):668–73.
- 4 23. Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture  
5 hygiene methods. J Prosthet Dent. 1984;52(2):158–63.
- 6 24. H Nikawa, T Yamamoto, T Hamada, S Sadamori SA. Cleansing Efficacy of  
7 commercial denture cleansers: Ability to Reduce *Candida albicans* biofilm  
8 Activity. Int J Prosthodont. 1995;8:527–34.
- 9 25. Chan EC, Iugovaz I, Siboo R, Bilyk M, Barolet R, Amsel R, et al. Comparison  
10 of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. J  
11 Can Dent Assoc. 1991;57(12):937–9.
- 12 26. Slade GD, Akinkugbe a. a., Sanders a. E. Projections of U.S. Edentulism  
13 Prevalence Following 5 Decades of Decline. J Dent Res [Internet]. United  
14 States; 2014 Oct;93(10):959–65. Available from:  
15 <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0022034514546165>
- 16 27. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated  
17 guidelines for reporting parallel group randomised trials. PLoS Med. United  
18 States; 2010 Mar;7(3):e1000251.
- 19 28. De Andrade IM, Cruz PC, Da Silva CHL, De Souza RF, De Freitas Oliveira  
20 Paranhos H, Candido RC, et al. Effervescent tablets and ultrasonic devices  
21 against *Candida* and mutans streptococci in denture biofilm. Gerodontology.  
22 2011;28(4):264–70.
- 23 29. Duyck J, Vandamme K, Krausch-Hofmann S, Boon L, Keersmaecker K De,  
24 Jalon E, et al. Impact of denture cleaning method and overnight storage  
25 condition on denture biofilm mass and composition: A cross-over randomized  
26 clinical trial. PLoS One. 2016;11(1).
- 27 30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:  
28 application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods.  
29 Netherlands; 1983 Dec;65(1–2):55–63.
- 30 31. Ferreira MÁF, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-  
31 Garcia RCM, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners  
32 contaminated with *Candida* species. Clin Oral Investig. 2009;13(2):237–42.
- 33 32. Drake D, Wells J, Ettinger R. Efficacy of denture cleansing agents in an in  
34 vitro bacteria-yeast colonization model. Int J Prosthodont [Internet].

- 1992;5(3):214–20. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1524643>
33. Hashiguchi M, Nishi Y, Kanie T, Ban S, Nagaoka E. Bactericidal efficacy of glycine-type amphoteric surfactant as a denture cleaner and its influence on properties of denture base resins. *Dent Mater J*. 2009;28(3):307–14.
34. Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent*. 1979;42(6):619–23.
35. Palenik CJ, Miller CH. In vitro testing of three denture-cleaning systems. *J Prosthet Dent*. 1984;51(6):751–4.
36. Shay K. Denture Hygiene: A Review and Update. *J Contemp Dent Pract Winter Issue J Contemp Dent Pract* [Internet]. 2000;1(2). Available from: <http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=1436&Type=FREE&TYP=TOP&IN=~eJournals/images/JPLOGO.gif&IID=122&isPD...>
37. Landa AS, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC, Busscher HJ. Recalcitrance of *Streptococcus mutans* biofilms towards detergent-stimulated detachment. *Eur J Oral Sci*. 1999;107(4):236–43.
38. Salles AES, Macedo LD, Fernandes RAG, Silva-Lovato CH, Paranhos H de FO. Comparative analysis of biofilm levels in complete upper and lower dentures after brushing associated with specific denture paste and neutral soap. *Gerodontology*. 2007;24(4):217–23.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. Netherlands; 1983 Dec;65(1–2):55–63.
40. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. United States; 2011;731:237–45.
41. Brambilla E, Gagliani M, Ionescu A, Fadini L, García-Godoy F. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dent Mater*. England; 2009 Sep;25(9):1067–72.
42. De Souza RF, De Freitas Oliveira Paranhos H, Lovato Da Silva CH, Abu-Naba’a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(4):CD007395.
43. Paranhos H de FO, Silva CHL da. Comparative study of methods for the quantification of biofilm on complete dentures. *Braz Oral Res* [Internet]. 2004;18(3):215–23. Available from:

1 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-)  
2 [83242004000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242004000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

- 3 44. Campos MS, Marchini L, Bernardes LAS, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm  
4 microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.*  
5 2008;23(5):419–24.
- 6 45. Morino T, Ookawa K, Haruta N, Hagiwara Y, Seki M. Effects of professional  
7 oral health care on elderly: Randomized trial. *Int J Dent Hyg.* 2014;12(4):291–  
8 7.

- 1 ANEXOS
- 2 Parecer de comitê de ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Ensaio clínico controlado randomizado de higienização de próteses totais em pacientes institucionalizados

**Pesquisador:** Rodrigo Nunes Rached

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 69748317.7.0000.0020

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.225.015

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa que será realizada em duas instituições de longa permanência de idosos da região metropolitana de Curitiba, os pesquisados cederão suas próteses dentárias que serão submetidas a dois tipos de higienização, esta realizada pelos pesquisadores e devolvidas a seus donos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia do banho de ultrassom em solução de detergente líquido neutro e comparar o mesmo à escovação tradicional com detergente líquido neutro na higienização de próteses totais de pacientes sob internação em duas instituições de longa permanência de idosos.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios foram previstos no projeto, estando em acordo com o Sistema CEP/Conep.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e metodologia adequada.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória adequados.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155  
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

1 **TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido**

2  
3 **AUTORIZAÇÃO**

4  
5  
6 Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, responsável pela Instituição de Longa  
7 Permanência de Idosos \_\_\_\_\_,  
8 autorizo a realização do “ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO DE  
9 HIGIENIZAÇÃO DE PRÓTESES TOTAIS EM PACIENTES  
10 INSTITUCIONALIZADOS” a ser conduzido pelos pesquisadores abaixo  
11 relacionados. Fui informado pelo responsável do estudo sobre as características e  
12 objetivos da pesquisa, bem como das atividades que serão realizadas na  
13 instituição a qual represento.

14 Declaro ainda ter lido e concordar com o parecer ético emitido pelo CEP da  
15 instituição proponente, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em  
16 especial a Resolução CNS 466/12. Esta instituição está ciente de suas  
17 corresponsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de  
18 pesquisa e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos  
19 sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a  
20 garantia de tal segurança e bem-estar.

21  
22  
23  
24 Curitiba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

25  
26  
27  
28 \_\_\_\_\_  
29 Assinatura e carimbo do responsável institucional

30  
31 **LISTA NOMINAL DE PESQUISADORES:**

32 Ana Paula Sponchiado

33 Rodrigo Nunes Rached  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**MAIORES DE 18 ANOS SEM CAPACIDADE DE EXERCER SUAS**  
**FUNÇÕES LEGAIS**

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do estudo “ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO DE HIGIENIZAÇÃO DE PRÓTESES TOTAIS EM PACIENTES INSTITUCIONALIZADOS” e que tem como objetivo avaliar a limpeza de próteses totais de pacientes sob internação em instituições de longa permanência de idosos em um equipamento de ultrassom e comparar com a escovação tradicional, ambas utilizando detergente líquido neutro. Acreditamos que é muito importante determinar um método eficaz e prático para higiene de próteses totais em pacientes sob internação em instituições de longa permanência de idosos, pois ajuda a prevenir algumas doenças bucais e sistêmicas.

**PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO**

A minha participação no referido estudo será de fornecer a minha dentadura para ser limpa uma vez ao dia pelos pesquisadores. A dentadura ficará com os pesquisadores por no máximo 20 minutos por dia. A pesquisa durará 10 dias, com uma pausa de uma semana no meio dela.

**RISCOS E BENEFÍCIOS**

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como aprimorar a limpeza da minha dentadura contribuindo para uma saúde bucal e geral melhor. Fui informado também que é possível que eu me sinta desconfortável por ficar sem minha dentadura por no máximo 20 minutos por dia por 10 dias. Dos quais medidas serão tomadas para a redução do meu desconforto, tais como tentar agilizar ao máximo os procedimentos da pesquisa para me devolver o mais prontamente possível a minha dentadura.

1                   **SIGILO E PRIVACIDADE**

2  
3           Estou ciente de minha privacidade respeitada, ou seja, meu nome ou  
4 qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma me identificar será  
5 mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e  
6 confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.  
7

8  
9                   **AUTONOMIA**

10  
11           É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é  
12 garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre  
13 o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante  
14 e depois da minha participação. Também fui informado de que posso recusar a  
15 participar do meu representado no estudo, ou retirar o consentimento a qualquer  
16 momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, este não  
17 sofrerá qualquer prejuízo à assistência que vem sendo recebida.  
18  
19  
20  
21

22                   **RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO**

23  
24           No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na  
25 pesquisa, tais como transporte, alimentação entre outros, haverá ressarcimento  
26 dos valores gastos em dinheiro.

27           De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação  
28 no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.  
29  
30

31                   **CONTATO**

32  
33           Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Rodrigo Nunes  
34 Rached (professor do Doutorado em Odontologia da PUC-PR) e Ana Paula  
35 Sponchiado (aluna do Doutorado em Odontologia da PUC-PR) e com eles poderei  
36 manter contato pelos telefones 98858-5888 e 99623-3613.  
37  
38

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (CEP) pelo telefone (41)3271-2292 entre segunda e sexta-feira das 08h00 as 17h30 ou pelo e-mail [nep@pucpr.br](mailto:nep@pucpr.br).

### DECLARAÇÃO

Declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito com as respostas. Entendo que receberei uma via assinada e datada deste documento e que outra via assinada e datada será arquivada nos pelo pesquisador responsável do estudo.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

| Dados do participante da pesquisa |  |
|-----------------------------------|--|
| Nome:                             |  |
| Idade:                            |  |

| Dados do responsável pelo participante da pesquisa |  |
|----------------------------------------------------|--|
| Nome:                                              |  |
| Telefone:                                          |  |

1  
2  
  
  
  
  
  
  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

Local, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da  
pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal do  
participante da pesquisa

### USO DE IMAGEM

Autorizo o uso imagens de minhas dentaduras para fins da pesquisa, sendo  
seu uso restrito a fotos digitais ou impressas.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da  
pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

# 1 Normas para publicação

2

## 3 JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE – JAOS

4

### 1 ESCOPO

O periódico **Journal of Applied Oral Science** tem como missão a divulgação dos avanços científicos e tecnológicos conquistados pelas comunidades odontológica e fonoaudiológica, respeitando os indicadores de qualidade, a fim de que seja assegurada a sua aceitabilidade junto à comunidade de pesquisadores da área em nível local, regional, nacional e internacional. Tem como objetivo principal publicar resultados de pesquisas originais no campo das ciências orais, com ênfase em Odontologia, Fonoaudiologia e áreas correlatas.

As submissões de relatos de casos (incluindo séries de casos e protocolos clínicos) não são mais aceitos pelo Journal of Applied Oral Science e os manuscritos de revisão (incluindo revisões sistemáticas) só podem ser submetidos a convite do editor.

Este periódico adota a licença Creative Commons CC-BY:

“Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original. É a licença mais flexível de todas as licenças disponíveis. É recomendada para maximizar a disseminação e uso dos materiais licenciados.”

#### 1.1 Custo de publicação

Não há cobrança aos autores para submissão de manuscritos e nem mesmo para processamento dos artigos (APC).

### 2 DAS NORMAS GERAIS

2.1 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua submissão simultânea em outro periódico, seja este de âmbito nacional ou internacional. O Journal of Applied Oral Science reserva todo o direito autoral dos trabalhos publicados, inclusive tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição com devida citação de fonte.

2.2 Só serão recebidos para publicação, trabalhos redigidos em inglês, ficando o conteúdo dos textos, das citações e das referências sob inteira responsabilidade dos autores.

2.3 O Journal of Applied Oral Science tem o direito de submeter todos os manuscritos ao Corpo Editorial, o qual está completamente autorizado a determinar a conveniência de sua aceitação, ou devolvê-los aos autores com sugestões e modificações no texto e/ou para

adaptação às regras editoriais da revista. Neste caso, o manuscrito será reavaliado pelo Editor-Chefe e Corpo Editorial.

2.4 Os conceitos afirmados nos trabalhos publicados são de inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do Editor-Chefe ou Corpo Editorial.

2.5 As datas do recebimento do original e da aceitação do artigo constarão quando da publicação.

2.6 O Journal Applied Oral Science é publicado exclusivamente em formato eletrônico.

### **3 CRITÉRIOS DE ARBITRAGEM**

3.1 Pré-Análise: os manuscritos serão submetidos aos Editores Associados -Chefes para apreciação quanto à adequação ao escopo da revista. Caso o manuscrito não esteja dentro dos parâmetros esperados serão rejeitados e devolvidos aos autores.

3.2 Revisão técnica: os trabalhos serão avaliados quanto ao cumprimento das normas de publicação e documentação exigidas na submissão dos manuscritos. Em caso de desacordo com as instruções serão devolvidos aos autores para as devidas adequações antes mesmo de serem submetidos à avaliação pelos Editores Associados e revisores.

3.3 Análise de mérito e conteúdo: os artigos aprovados pelos Editores Associados serão avaliados quanto ao mérito e método científico por no mínimo dois relatores *ad hoc* de unidades distintas à de origem do trabalho, além do Editor-Chefe.

3.3.1 Como parte do processo de avaliação, todos os manuscritos serão submetidos à análise feita por um software de plágio.

3.3.2 O Editor-Chefe decidirá sobre a aceitação do manuscrito. Quando necessária revisão do original, o manuscrito será devolvido ao autor correspondente para modificação. Uma versão revisada com as alterações efetuadas deverá ser re-submetida pelos autores e será reavaliada pelo Editor-Chefe, Editores Associados e revisores conforme a necessidade.

3.4 Após aprovação quanto ao mérito científico, os trabalhos serão submetidos à revisão final da língua inglesa, feita por profissional autônomo indicado pela revista. Nos casos de inadequação os trabalhos serão encaminhados para os autores para revisão.

3.5 Tanto os avaliadores quanto os autores, durante todo o processo de tramitação dos artigos, não são identificados pela outra parte.

3.6 Os conceitos emitidos nos trabalhos publicados serão de responsabilidade exclusiva dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do Editor-Chefe ou Corpo Editorial.

## **4 DA CORREÇÃO DAS PROVAS TIPOGRÁFICAS**

4.1 A prova tipográfica será enviada ao autor correspondente por meio de correio eletrônico em formato PDF para aprovação final.

4.2 O autor disporá de um prazo de 48 horas para correção e devolução do original devidamente revisado, se necessário.

4.3 Apenas pequenas modificações, correções de ortografia e verificação das ilustrações serão aceitas. Modificações extensas implicarão na reapreciação pelos assessores e atraso na publicação do trabalho.

4.4 Se não houver retorno da prova em 48 horas, o Editor-Chefe considerará como final a versão sem alterações.

4.5 A inclusão de novos autores não é permitida nesta fase do processo de publicação.

4.6 É de inteira responsabilidade dos autores verificarem o devido uso de seus nomes científicos no manuscrito.

1

## **2 Forma e preparação de manuscritos**

### **1 APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO**

#### **1.1 Estrutura do manuscrito**

1.1.1 Página de rosto deverá ser submetida como arquivo suplementar deverá conter apenas:

- O título do manuscrito em inglês.
- Os nomes dos autores na ordem direta seguido da sua afiliação institucional. Para autores brasileiros as afiliações devem vir em português, em espanhol para latino-americanos e em inglês para as demais nacionalidades.
- Endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências devem ser endereçadas, incluindo telefone e endereço de e-mail.

#### **1.1.2 Texto**

- O artigo deverá ser previamente traduzido ou revisado por empresa ou profissional autônomo que assegurem a qualidade do texto. Autores que tenham a língua inglesa como nativa deverão apresentar declaração na qual se responsabilizam pela redação.
- Título do trabalho em inglês;
- Resumo estruturado em parágrafo único: deverá incluir o máximo de 300 palavras, ressaltando-se no

texto uma pequena introdução, objetivo, material e métodos, resultados e conclusões.

- Palavras-chave: (correspondem às palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo). Para determinação das palavras-chave os autores deverão consultar a lista de assuntos do [MeSh](#) e os Descritores em Ciências da Saúde - [DeCS](#). Deve-se usar ponto final para separar as palavras-chave, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introdução: resumo do raciocínio e a proposta do estudo, citando somente referências pertinentes. Estabelecer a hipótese do trabalho.
- Material e Métodos: o material e os métodos são apresentados com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes depois da primeira menção dos produtos, reagentes ou equipamentos. Métodos publicados devem ser referenciados e discutidos brevemente, exceto se modificações tenham sido feitas. Indicar os métodos estatísticos utilizados, se aplicável. Consultar o item 3 para princípios éticos e registro de ensaios clínicos.
- Resultados: apresenta os resultados em uma sequência lógica no texto, com tabelas e ilustrações. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e ilustrações possível.
- Discussão: enfatizar os aspectos novos e importantes do estudo e as conclusões resultantes. Não repetir em detalhes dados ou informações citadas na introdução ou resultados. Relatar observações de outros estudos relevantes e apontar as implicações de seus achados e suas limitações.
- Conclusão(ões): (quando houver).
- Agradecimentos (quando houver) - agradeça a pessoas que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo. Especifique auxílios financeiros citando o nome da organização de apoio de fomento e o número do processo.
- Referências (ver item 2.3)

## **2 NORMALIZAÇÃO TÉCNICA**

O manuscrito deve ser digitado com: espaçamento de 1,5, fonte Arial, tamanho 11, 3 cm de margem de cada um dos lados, papel A4, perfazendo um total de, no máximo, 15 páginas, incluindo ilustrações (gráficos, fotografias, tabelas etc).

### **2.1 Ilustrações e Tabelas**

2.1.1 As ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, quadros etc.), serão consideradas no texto como figuras,

sendo limitadas ao mínimo indispensáveis e devem ser adicionadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto.

2.1.2 As ilustrações deverão ser encaminhadas em formato .tiff, ou .jpg, com no mínimo 300 dpi de resolução e 10 cm de largura. Esses arquivos deverão estar separados e não inseridos no texto do Word.

2.1.3 As tabelas deverão ser logicamente organizadas, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. A legenda será colocada na parte superior das mesmas. As tabelas deverão ser abertas nas laterais direita e esquerda. As tabelas deverão ser enviadas em formato .xls.

2.1.4 As legendas correspondentes deverão ser claras, concisas e localizadas ao final do trabalho em forma de lista separada e precedidas da numeração correspondente.

2.1.5 As notas de rodapé de ilustrações e tabelas serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

## **2.2 Citação de autores**

A citação dos autores no texto poderá ser feita de duas maneiras:

1) Somente numérica: "... and interfere with the bacterial system and tissue system"<sup>3,4,7-10</sup>. As referências devem ser citadas em ordem crescente no parágrafo.  
2) ou alfanumérica:

- Um autor: Gatewood<sup>31</sup> (2012)
- Dois autores: Cotti and Mercurio<sup>19</sup> (2016)
- Três autores: Azar, Safi, Nikaein<sup>27</sup> (2012)
- mais que três autores: Gealh, et al.<sup>28</sup> (2014)
- Caracteres de pontuação tal como pontos e vírgulas devem ser colocados depois da citação numérica dos autores. Ex: Ferreira<sup>38</sup> (2015).

## **2.3 Referências**

As Referências deverão obedecer aos requisitos "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver", para a submissão de manuscritos a revistas biomédicas - disponível no seguinte endereço eletrônico:

[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

2.3.1 Toda referência deverá ser citada no texto. Elas devem ser ordenadas de acordo com sua apresentação no texto e numeradas sequencialmente em ordem crescente.

As abreviaturas dos títulos dos periódicos internacionais citados deverão estar de acordo com o padrão [MEDLINE](#)

2.3.2 Não incluir comunicações pessoais e materiais bibliográficos sem data de publicação na lista de referências.

2.3.3 Teses, dissertações, monografias e resumos não serão aceitos como referências.

2.3.4 Listar os nomes dos 6 primeiros autores do trabalho; excedendo este número, os 6 primeiros autores do trabalho devem ser citados, seguidos pela expressão ", et al.", que deve ser seguida por ponto e não escrita em itálico. Ex: Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, Lima VM, et al.

2.3.5 Não ultrapassar a citação de 40 referências.

Exemplos de referências:

#### **Livro**

Preedy VR, organizator. Fluorine: chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015.

#### **Capítulo de Livro**

Buzalaf CP, Leite AL, Buzalaf MA. Fluoride metabolism. In: Preedy VR, organizator. Fluorine: chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015. p. 54-72.

#### **Artigo de periódico**

Gorduysus M, Nagas E, Torun OY, Gorduysus O. A comparison of three rotary systems and hand instrumentation technique for the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal. Aust Endod J. 2011;37(3):128-33.

#### **Artigo de periódico exclusivamente na Internet (com identificador eletrônico)**

Rudolph H, Ostertag S, Ostertag M, Walter MH, Luthardt RG, Kuhn K. Reliability of light microscopy and a computer-assisted replica measurement technique for evaluating the fit of dental copings. J Appl Oral Sci [Internet]. 2018[cited 2017 Dec 12];26:e20160590. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0590>

#### **Artigo de periódico com DOI**

Wagner F, Strasz M, Traxler H, Schicho K, Seemann R. Evaluation of an experimental oblique plate for osteosynthesis of mandibular condyle fractures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2017;124(6):537-41. doi: 10.1016/j.oooo.2017.09.004

**Artigo de periódico Epub ahead of print/In press/Forthcoming**

Nair R, Chiu SE, Chua YK, Dhillon IK, Li J, Yee RT. Should short-term use of alcohol containing mouthrinse be avoided for fear of worsening xerostomia? J Oral Rehabil. Forthcoming 2017. doi: 10.1111/joor.12587

**Artigos com mais de 6 autores:**

Citam-se até os 6 primeiros seguidos da expressão " ,et al."

Grubbs V, Plantinga LC, Crews DC, Bibbins-Domingo K, Saran R, Heung M, et al. Vulnerable populations and the association between periodontal and chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6:711-7

**Volume com suplemento e/ou Número Especial**

Davidsdson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

**3 PRINCÍPIOS ÉTICOS E REGISTROS DE ENSAIOS CLÍNICOS**

**3.1 Procedimentos experimentais em animais e humanos.** O periódico Journal of Applied Oral Science endossa os princípios incorporados na Declaração de Helsinki e insiste que todas as pesquisas que envolvam seres humanos publicadas nesta Revista, sejam conduzidas em conformidade com esses princípios e com outros similares dispostos nos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa das respectivas instituições de origem dos autores. No caso de experimentos com animais, estes devem seguir os mesmos princípios de ética envolvidos. Em experimentos que envolvam procedimentos cirúrgicos em animais, os autores devem descrever na seção de Material e Métodos evidências de que a dosagem anestésica produziu efeito adequado e por tempo necessário para a condução do ato cirúrgico. Todos os experimentos com humanos ou animais devem vir acompanhados de descrição, na seção de Material e Métodos, de que o estudo foi aprovado pelos respectivos órgãos que gerenciam a Ética em Pesquisa nas suas instituições de origem.

3.1.1 Artigos apresentando **estudos experimentais em humanos ou animais** deverão **obrigatoriamente** vir acompanhados de documento comprobatório da aprovação pelo Comitê de Ética.

3.1.2 Artigos apresentando estudos em animais deverão obrigatoriamente vir acompanhados de Checklist ARRIVE devidamente preenchido. O documento está disponível no link a seguir:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/societyimages/jaos-scielo/ARRIVEChecklist.docx>

3.1.3 Relatórios emitidos em língua que não inglês, espanhol e português devem ser traduzidos para o inglês.

### 3.2 Registros de Ensaios Clínicos

O periódico Journal of Applied Oral Science apóia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE), reconhecendo a importância dessas iniciativas para o registro e divulgação internacional sobre estudos clínicos com acesso aberto. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham o registro, em uma das plataformas de ensaios clínicos, validadas pelos critérios estabelecidos pela OMS e pelo ICMJE. A OMS define Ensaio Clínico como "qualquer estudo de pesquisa que prospectivamente designa participantes humanos ou grupos de humanos para uma ou mais intervenções relacionadas à saúde para avaliar os efeitos e os resultados de saúde. Intervenções incluem, mas não se restringem a drogas, células e outros produtos biológicos, procedimentos cirúrgicos, procedimentos radiológicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, mudanças no processo de cuidado, cuidado preventivo etc."

3.2.1 Os artigos que envolvam ensaios clínicos (clinical trials) em voluntários humanos deverão ser enviados acompanhados de dois documentos suplementares **obrigatórios**:

- checklist do CONSORT 2010 (<http://www.consort-statement.org/>)
- comprovante de número de registro da pesquisa em base que atenda às exigências da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE).
- Sugestões para autores brasileiros: <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/>
- Sugestão para autores brasileiros ou de outras nacionalidades: <http://www.controlled-trials.com/> (ISRCTN) ou <http://prsinfo.clinicaltrials.gov/>).

3.3 O Editor-Chefe e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou cujos métodos empregados forem considerados inapropriados para o uso de humanos ou animais.

#### **4 OUTRAS QUESTÕES SERÃO RESOLVIDAS PELO EDITOR-CHEFE E CONSELHO EDITORIAL**

1

## **2 Envio de manuscritos**

### **1 SUBMISSÃO DO TRABALHO**

1.1 Os manuscritos deverão ser submetidos por meio do endereço: <https://mc04.manuscriptcentral.com/jaos-scielo>

1.2 O arquivo original contendo o manuscrito deve ser submetido sem a identificação dos autores e afiliações. A folha de rosto deverá ser submetida como arquivo suplementar (Title page) contendo o nome dos autores, afiliações e endereço para correspondência.

1.3 As figuras devem ser submetidas como arquivos suplementares de acordo com as especificações do item 2.1 sobre forma e preparação dos manuscritos.

1.4 As tabelas devem ser preparadas em formato Excel e devem ser submetidas como arquivos suplementares.

1.5 Documentos comprobatórios de registro de ensaios clínicos e de aprovação de relatórios por Comitê de Ética deverão ser submetidos como arquivos suplementares obrigatórios.

1.6 O comprovante de revisão da língua inglesa (termo de responsabilidade assinado ou comprovante emitido por empresa) deverá ser submetido como arquivo suplementar obrigatório.

1.7 O [formulário de submissão](#), assinado por TODOS os autores, deve ser submetido como arquivo suplementar.

1.8 O Journal Applied Oral Science recomenda a inclusão do número de registro ORCID dos autores para submissão dos manuscritos. Todos os autores devem associar o número de registro no [ORCID](#) ao seu perfil no ScholarOne.

3