

Terapia fotodinâmica como alternativa de controle de candidíase em resinas de base de prótese e suas implicações quanto à estabilidade de cor

Photodynamic therapy as an alternative to control candidiasis in prosthesis-based resins and its implications for color stability

DOI:10.34117/bjdv7n7-407

Recebimento dos originais: 07/06/2021

Aceitação para publicação: 19/07/2021

Mauricio da Rocha Costa

Estudante de graduação em Odontologia. Contribuição: contribuiu com participação efetiva científica e intelectual no estudo, e escreveu o artigo
mauricio.upe@gmail.com

Nathalia Alexandre Eloy Lins

Estudante de graduação em Odontologia. Contribuição: contribuiu com participação efetiva científica e intelectual no estudo, e escreveu o artigo 2015102079
2015102079@app.asc.es.edu.br

Patrícia Lins Azevedo do Nascimento

DDS, PhD. Contribuição: contribuiu substancialmente com o desenho experimental, interpretação dos dados e revisão crítica do trabalho
patricianascimento@asc.es.edu.br

Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota

DDS, PhD. Contribuição: contribuiu com a ideia, hipótese e desenho do estudo; revisão crítica do trabalho
Endereço: Av. Portugal, 1019 - Universitário, Caruaru - PE, 55016-901
claudiamota@asc.es.edu.br

RESUMO

Objetivos: Avaliar o potencial da terapia fotodinâmica (PDT) no controle de *Candida albicans* em resina para base de prótese, e a estabilidade de cor deste material. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo experimental laboratorial. Foram confeccionados 25 discos de resina acrílica autopolimerizável, divididos em 5 grupos: controle positivo, Nistatina (NIS); controle negativo microbiológico, sem tratamento; experimental químico, Clorexidina 0,12% (CLX); experimental PDT/Azul de metileno 0,01% (PDTAM); experimental PDT/Verde malaquita 0,1mg/ml (PDTVM). Todos os corpos de prova foram expostos à cultura de *C. albicans* (URM 6398) previamente à aplicação do tratamento indicado por 96 horas para formação do biofilme. Os grupos PDT foram irradiados com laser vermelho (660 nm, 100 mW, 210 J/cm²). A mensuração de cor foi realizada antes e após o tratamento antifúngico com o espectrofotômetro Chroma Meter (Konica Minolta) por meio do sistema CIELAB. **Resultados:** Os grupos PDT apresentaram redução microbiana. Os grupos Clorexidina e Nistatina confirmaram seu

potencial inibitório frente *C. albicans*. Os valores de ΔE para os grupos NIS, CLX, PDTAM e PDTVM foram $3,665 \pm 1,3$, $2,641 \pm 0,6$, $2,869 \pm 1,5$ e $3,993 \pm 0,6$ respectivamente ($p = 0,0003$). **Conclusão:** PDTAM constitui uma alternativa viável para o tratamento de candidíase, sendo um método de baixo custo se comparado ao tratamento convencional. Estudos futuros são necessários para estabelecer um protocolo clínico com quantidade e intervalos de sessões definidos.

Palavras-chave: Materiais dentários, Polimetil metacrilato, Terapia fotodinâmica, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the potential of photodynamic therapy (PDT) in the control of *Candida albicans* in resin for prosthesis base, and its color stability. **Material and methods:** This is an experimental laboratory study. 25 self-curing acrylic resin discs were made, divided into 5 groups: positive control, Nystatin (NIS); negative microbiological control, without treatment; chemical experiment, 0.12% Chlorhexidine (CLX); experimental PDT / 0.01% Methylene Blue (PDTAM); experimental PDT / Malachite Green 0.1mg/ml (PDTVM). All specimens were exposed to *C. albicans* (URM 6398) culture prior to the application of the indicated treatment during 96 hours for the biofilm growth. The PDT groups were irradiated with red laser (660 nm, 100 mW, 210 J/cm²). The colorimetric measurement was performed before and after the antifungal treatment with the spectrophotometer Chroma Meter (Konica Minolta) using the CIELAB system. **Results:** The PDT groups showed microbial reduction, whilst the chlorhexidine and nystatin groups confirmed their inhibitory potential against *C. albicans*. The ΔE values for the NIS, CLX, PDTAM and PDTVM groups were 3.665 ± 1.3 , 2.641 ± 0.6 , 2.869 ± 1.5 and 3.993 ± 0.6 , respectively ($p = 0.0003$).

Conclusion: PDTAM is a viable alternative for the treatment of candidiasis, being a low-cost method when compared to conventional treatment. Future studies are necessary to establish a clinical protocol with defined number and intervals of PDT sessions.

Keywords: Dental materials, Polymethyl methacrylate, Photodynamic therapy, *Candida albicans*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil vive uma transição demográfica caracterizada pela diminuição da taxa de fecundidade e natalidade, resultando no aumento da população idosa.¹ Concomitantemente observa-se que as projeções para 2040, é de que as mandíbulas edêntulas serão praticamente nulas entre adolescentes, 1,77% dos adultos, mas 85,96% entre a população idosa.²

Assim, com a finalidade de suprir a demanda estética e funcional, as próteses são bastante empregadas, principalmente na população idosa. Estes dispositivos de reabilitação são constituídos por um material que difere do epitélio vivo, não sofrendo o processo de descamação natural que, somado com a adesão de uma película de saliva,

atuam como um retentor de placa e nicho para estabelecer uma infecção por *Candida albicans*. Visto isso, a colonização é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de estomatite relacionada à prótese, a manifestação clínica mais comum da infecção por cândida nestes usuários.^{3,4}

A candidíase é uma infecção oportunista mais comum, geralmente causada por leveduras do gênero *Candida*, sendo a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* as responsáveis por mais de 80% dos casos de infecção clínica. Dessas três espécies, a *Candida albicans* é a mais patogênica, além disso é encontrada em mais de 75% da população.^{5,6} Adesão de células fúngicas aos tecidos humanos, bem como a substratos abióticos, como as próteses dentárias, seguida pela formação de biofilme, pode ser mediada por proteínas da parede celular através de várias interações químicas com moléculas de superfície. Observa-se ainda que a falha no tratamento de candidíase oral apresenta relação direta com a complexa estrutura dos biofilmes que dificulta a penetração e a ação dos agentes antifúngicos.⁵

As diretrizes atuais para o tratamento preconizam o uso de Clotrimazol, Miconazol ou Nistatina tópicos para infecções leves e Fluconazol oral para lesões moderadas a graves. Outrossim, é necessário a desinfecção ou substituição da prótese dentária contaminada. Todavia, a formação de biofilme nas superfícies do hospedeiro e nas bases de próteses de resina acrílica tornam-se resistentes a medicamentos antifúngicos, evidenciando a necessidade de novos agentes antifúngicos eficazes e não tóxicos.⁷

A terapia fotodinâmica (PDT), é uma modalidade terapêutica que tem se mostrado promissora na inativação de microrganismos patogênicos. Trata-se da associação de um agente fotossensibilizador a uma fonte de luz, com o intuito de causar necrose e morte celular microbiana. Além disso, a PDT tem sido reconhecida por exercer uma ação imunomoduladora, influenciando a contagem e o comportamento das células imunes.⁸ Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da terapia fotodinâmica no tratamento de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica para base de próteses, e as implicações do tratamento à estabilidade de cor deste material através de um estudo laboratorial experimental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental laboratorial, utilizando corpos de prova constituídos de resina acrílica autopolimerizável.

3 CONFECCÃO DAS AMOSTRAS

O material utilizado para confecção das amostras foi a resina acrílica autopolimerizável JET (Clássico, Brasil) transparente, comercializada na forma de pó e líquido. O pó apresenta em sua composição polimetilmetacrilato, peróxido de benzoila e pigmento biocompatível. O líquido, por sua vez, é composto por metilmetacrilato de metila e hidroquinona. Foi respeitada a proporção de 3:1 (pó e líquido) na manipulação da resina acrílica para confecção dos corpos de prova ($n = 25$); esse processo consiste em molhar o pó com o líquido, para obtenção de uma massa plástica que pode ser modelada.

Para confecção das amostras foi utilizada uma matriz de discos de alumínio medindo 20 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Estes discos foram incluídos em mufla metálica com silicone de condensação laboratorial de alta viscosidade Zetalabor (Zhermack, São Paulo, Brasil) e levados à prensa hidráulica até a reação de presa do silicone. Após reabertura da mufla, foram retirados os discos de alumínio e inserida a resina acrílica, e mais uma vez a mufla foi fechada e levada e prensada com uma tonelada em prensa hidráulica até completar a reação química de presa.

Em seguida as amostras foram armazenadas em água destilada por 48 horas, para eliminação de monômero residual. Para acabamento foram utilizadas fresas de tungstênio Maxicut (American Burrs, Palhoça, Brasil) acopladas a turbina de baixa rotação e lixas d'água com granulação de 300, 600 e 800. Em seguida foi empregada a sequência de polimento mecânico em torno mecânico, utilizando pedra-pomes (SSWhite, Rio de Janeiro, Brasil) e água com escovas de pelo, seguido por pasta branco de Espanha (Lysanda, São Paulo, Brasil) e água em roda de pano. Apenas uma das faces dos discos de resina acrílica recebeu polimento, mimetizando as condições de uma base de prótese, em que a face que fica em contato com palato do paciente não recebe polimento. Em seguida foram armazenadas novamente em água destilada ao abrigo de luz por mais 48 horas.

4 CONTAMINAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA E CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

Para o processo de contaminação das amostras, todos os grupos foram expostos à inoculação de *Candida albicans* (URM 6398). Foi preparado o caldo Saboraud-Dextrose e vertido o inóculo no interior de tubos de ensaio contendo 20 ml do caldo. Os tubos de ensaio com inóculo foram armazenados em estufa microbiológica a 37°C durante 48h para crescimento, seguida por padronização destes.

A padronização teve como objetivo ajustar a concentração do inóculo no momento do experimento, fazendo com que esta fique entre 0,08 e 0,1, o que equivale a $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml, e corresponde ao valor 0,5 da Escala de Mac Farland. A escala de Mac Farland é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos. Esta multiplicação se manifesta nos meios líquidos por um aumento das partículas (microrganismos) que se opõem a livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio.⁹

Para a padronização, foram colocados 1,5 ml de caldo estéril e 1,5 ml do caldo contendo o inóculo crescido em um novo tubo de ensaio, e observado o padrão de turbidez da solução por meio da comparação, a olho nu, com o tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. O processo de padronização continuou até que a turbidez do novo tubo estivesse semelhante ao da Escala, retirando volume do tubo padronizado e acrescentando a mesma proporção de caldo *Sabouraud* dextrose esterilizado.

Com o inóculo padronizado foi realizada, então, a contaminação das amostras. Foram dispensadas em tubos Falcon 4 ml do caldo esterilizado e 1 ml do inóculo. Em seguida, as amostras (previamente esterilizadas) foram colocadas no interior destes tubos com a ajuda de uma pinça clínica estéril. Os tubos Falcon foram então numerados e armazenados em estufa microbiológica a 37°C durante 96 horas. No decorrer desse período, foi realizada uma troca de meio de cultura após as primeiras 48 horas, para manter os nutrientes do caldo viáveis para as leveduras.

Após a inoculação, alíquotas do caldo foram removidas, submetidas à diluição seriada em água destilada (10 ml) e semeadas em meio de cultura sólido Agar Sabouraud nas placas de Petri. Estas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 48 horas. Depois desse período, observou-se o crescimento das unidades formadoras de colônia.

5 MEIOS DE CONTROLE E ANÁLISE DE ATIVIDADE MICROBIANA

Os grupos experimentais foram definidos de acordo com o método terapêutico para o controle do biofilme, conforme disponível no quadro 1.

As amostras submetidas à PDT foram irradiadas com laser de diodo vermelho (Therapy XT, DMC, Pinhais, Brasil), operando com 660 nm de comprimento de onda central, 100 mW de potência de saída e densidade de energia de 250 J/cm^2 . O laser emitido possui 10 nm de largura de banda e 600 μm de diâmetro do feixe. O fotossensibilizador

foi aplicado na superfície das amostras e, após 5 minutos de tempo de pré-irradiação, as amostras foram irradiadas em três pontos equidistantes.

Adicionalmente alíquotas do caldo foram removidas do tubo Falcon e padronizadas; em seguida foram semeadas em placa de 96 poços juntamente com o fotossensibilizante. Para o grupo PDTVM utilizou-se Verde malaquita 0,1mg/ml, e para o grupo PDTAM, utilizou-se Azul de metileno 0,01%. Para ambos foi respeitado o tempo de pré-irradiação determinado anteriormente e em seguida foi realizado a irradiação de cada poço, com a ponteira do laser em contato direto com a tampa da placa de 96 poços, de modo a padronizar a distância até a amostra. Após a irradiação com laser, o conteúdo dos poços foi semeado em placas de Petri contendo meio de cultura sólido e incubadas em estufa microbiológica (48h/37°C).

Para os grupos com tratamento convencional, os discos de resina acrílica foram imersos no meio de tratamento por 24 horas. O grupo NIS ficou imerso em 5 ml de Nistatina 100.000 UI, enquanto o grupo CLX foi imerso em 5 ml de Digluconato de Clorexidina 0,12%; para o grupo CN, os discos de resina permaneceram imersos apenas em água destilada estéril. Em seguida alíquotas do conteúdo de cada tubo Falcon foram removidas e semeadas em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido e incubadas em estufa microbiológica (48h/37°C) para posterior contagem de unidades formadoras de colônias, onde foi realizado a comparação entre os resultados das placas de crescimento e de inibição, sendo assim possível confirmar a ocorrência de inibição ou mesmo a redução de colônias após o uso dos métodos de tratamento.

6 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

A análise colorimétrica foi realizada através da espectrofotometria de reflectância. Foram tomadas as medidas colorimétricas de todas as amostras no período anterior e ao término da avaliação de crescimento/tratamento de biofilme, com o intuito de verificar se métodos para controle microbiano de próteses dentárias interferem na estabilidade de cor da resina acrílica avaliada. Para tal foi utilizado o Espectrofotômetro Croma Meter CR-400 (Konika Minolta, Sensing, Japão).

Os valores de cada amostra foram expressos de acordo com o sistema de cor da Commission Internationale de L' Eclairage LAb (CIELAB), utiliza três parâmetros: L^* , a^* , e b^* , onde L^* indica o brilho, e a^* e b^* descrevem o valor de verde-vermelho e azul-amarelo, respectivamente.¹⁰ Os valores totais da diferença de cor (ΔE^*) entre as medições

inicial e final foram expressos como a distância entre dois pontos no espaço e calculados de acordo com a seguinte fórmula:¹¹

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Onde:

ΔL^* representa a diferença entre os valores de L^* após as leituras final e inicial ($L_1^* - L_0^*$),

Δa^* , a diferença entre os valores de a^* após as leituras final e inicial ($a_1^* - a_0^*$),

Δb^* , a diferença entre os valores de b^* após as leituras final e inicial ($b_1^* - b_0^*$).

Foram realizadas três leituras de colorimetria para cada amostra. Sendo assim, os grupos que apresentam valor de L^* positivo, mais branca/ luminosa a imagem é, quanto mais negativo o valor de L^* mais escura a imagem é. Para os valores de a^* quando se tem número positivo, a imagem apresenta coloração vermelha, já para números negativo, a imagem apresenta coloração é verde. Para os valore de b^* , se o estiver positivo a imagem apresenta coloração amarela, já para números negativos a imagem apresenta coloração azul.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Foi realizada a estatística descritiva calculando as médias e os desvios-padrão de cada grupo. Determinou-se uma distribuição não-normal foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar se há diferença entre os grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Na análise das amostras dependentes foi realizado o Teste de Wilcoxon para dados pareados. A significância estatística de todos os testes foi considerada como $p < 0,05$.

8 RESULTADOS

Os grupos NIS e CLX apresentaram inibição completa, confirmando seu potencial inibitório frente *Candida albicans*. Já os grupos tratados com PDT apresentaram redução microbiana, no entanto não apresentaram inibição completa. O Azul de Metileno apresentou melhor desempenho, se comparado ao Verde Malaquita.

A tabela 1 mostra os valores médios registrados de ΔE^* , que corresponde à diferença entre as medições de cor final e inicial, expressos como a distância entre dois

pontos no espaço. Observa-se que há uma maior média no grupo Verde malaquita ($3,993 \pm 0,6$) e Nistatina ($3,665 \pm 1,3$), correspondendo aos grupos que tiveram maior manchamento da resina. Já o Azul de metileno ($2,869 \pm 1,5$) e a Clorexidina ($2,641 \pm 0,6$) apresentam os menores valores, representando os grupos com menor manchamento. Além disso, o teste de Kruskal-Wallis confirma as diferenças estatísticas nos presentes grupos ($p < 0,0003$).

O teste de comparações múltiplas de Dunn revelou que o manchamento causado pelo Verde malaquita foi estatisticamente significativo se comparado ao manchamento causado pelo Azul de metileno ou pela Clorexidina, todavia, não houve diferença estatística se comparado ao manchamento causado pela Nistatina (Tabela 2).

Foi realizada uma comparação intra-grupo das médias ΔL^* , Δa^* , e Δb^* , encontrando diferenças estatísticas em todas as intervenções estudadas, conforme apresentado na tabela 3.

Observa-se na tabela 4 as médias das medidas iniciais e finais de todos os vetores analisados, L^* , a^* , e b^* , nos momentos inicial e final.

9 DISCUSSÃO

Os usuários de prótese dentária apresentam maior frequência de candidíase do que os não usuários, sendo a *C. albicans* a mais frequentemente isolada. A insuficiência nos cuidados de higienização da prótese está diretamente associada ao desenvolvimento da candidíase oral, uma vez que acaba sendo um fator retentivo de biofilme. O estudo de Bianchi e colaboradores¹² evidenciou que os pacientes que utilizaram próteses dentárias removíveis eram 6,9 vezes mais propensos a desenvolver candidíase oral quando comparado a idosos não portadores. Esse fator é preocupante, uma vez que a maioria dos portadores de prótese são idosos.

Levando em consideração a crescente resistência microbiana aos antifúngicos, bem como a alta incidência de reações adversas às terapêuticas convencionais, é fulcral desenvolver terapias alternativas para a candidíase oral, que trariam mais conforto e seriam mais eficazes no combate a proliferação dos micro-organismos. Silva *et al.*¹³, confirmaram a eficácia da terapia fotodinâmica com laser de baixa potência e azul de metileno sobre as espécies de *Candida*, com o melhor tempo de irradiação sendo o de 282 segundos. Resultado semelhante é observado no estudo de Senna *et al.*¹⁴, que compararam a atividade antifúngica da PDT ao uso tópico de Miconazol gel a 2% em um ensaio clínico. O grupo PDT usou como fotossensibilizador o azul de metileno a 450 $\mu\text{g/mL}$ e

um laser de diodo ($\lambda = 660 \text{ nm}$) com 100 mW e fluência de 28 J/cm^2 ; os resultados mostraram que o PDT foi significativamente mais eficaz que o miconazol na melhora da inflamação após 15 dias. O presente estudo, por sua vez, estabeleceu um protocolo de banca laboratorial, sendo realizada uma única sessão de PDT com poucos minutos de duração, enquanto os grupos CLX e NIS permaneceram em contato com a solução de tratamento por 24 h – isso possivelmente justifica porque os grupos PDTAM e PDTVM tiveram redução microbiana, e não inibição, visto que clinicamente são necessárias mais sessões. Nesse sentido, sugere-se um estudo posterior, a fim de estabelecer um protocolo clínico com número de sessões e intervalo entre elas planejado.

Desse modo, este estudo evidenciou a eficácia de uso da Terapia Fotodinâmica (PDT) no tratamento da candidíase oral, bem como manchamento da prótese dentária comparando com o tratamento convencional.

Resina acrílicas apresentam algumas propriedades indesejadas, como por exemplo a baixa resistência ao desgaste, absorção de odores e instabilidade de cor, uma vez que são susceptíveis a ação de corantes orgânicos, água, luz solar e agentes químicos¹⁵. De acordo com Fernandes¹⁶, a alteração de cor das resinas acrílicas pode ser ocasionada em decorrência da absorção que adsorção de líquidos através dos polímeros dependentes da composição química do PMMA.

O digluconato de Clorexidina a 0,12%, por sua vez, é um antisséptico de amplo espectro contra várias bactérias e fungos, incluindo a *Candida albicans*, e tem eficácia clínica e microbiológica comprovada contra estomatite protética. Em contrapartida, alguns autores apontam um possível obstáculo para o uso dessa terapêutica, que consiste no manchamento da resina acrílica decorrente da descontaminação diária com o digluconato de clorexidina^{17,18}. A PDT com azul de metileno causou menos manchamento de superfície, quando comparado à nistatina, considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento de candidíase protética. Adicionalmente o azul de metileno apresenta vantagens adicionais, como o baixo custo, fácil aplicação e ausência de efeitos adversos.

Poucos estudos avaliam a estabilidade de cor das resinas acrílicas de uso em prótese dentária^{17,18}, de maneira que esse estudo é promissor, considerando o menor manchamento relacionado ao PDTAM.

10 CONCLUSÃO

Os grupos tratados com a terapia fotodinâmica apresentaram redução de microrganismos, confirmando sua efetividade. No tocante à alteração de cor, o grupo

PDTAM apresentou manchamento semelhante ao grupo CLX, e inferior à NIS, considerada padrão-ouro para tratamento de candidíase; PDTVM registrou os índices mais elevados de manchamento, não sendo indicado para uso clínico. Os resultados propõem a terapia fotodinâmica com Azul de metileno como uma alternativa terapêutica no controle de candidíase em usuários de próteses removíveis – com base na capacidade de controle microbiano com baixo custo, livre de efeitos colaterais sistêmicos e sem danos estéticos às próteses dos pacientes. Estudos posteriores são necessários, com o intuito de estabelecer um protocolo clínico de PDTAM, determinando a quantidade de sessões e o intervalo de tempo entre elas.

REFERÊNCIAS

1. Silva AER, Kunrath I, Danigno JF, Cascaes AM, Castilhos ED, Langlois CO, Demarco FF. A Saúde bucal está associada à presença de sintomas depressivos em idosos? *Ciência & Saúde Coletiva*. 2019; 24(1):181-188.
2. Cardoso M et al. Edentulism in Brazil: trends, projections and expectations until 2040. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2016; 21(4):1239-1245.
3. Morse DJ et al. Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. *J Med Microbiol. Londres*. 2018;67(3):364–375.
4. Gaucha LMR et al. Isolation of *Candida* spp. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2014;(49):1-14
5. Carmello, J. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy reduces adhesion capacity and biofilm formation of *Candida albicans* from induced oral candidiasis in mice Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2019;27:402–407.
6. Collina GA et al. Controlling Methylene Blue aggregation: a more eficiente alternative to treat *Candida albicans* infections using Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2018;17(10):1355-1364
7. Namangkalakul W et al. Activity of chitosan antifungal denture adhesive against common *Candida* species and *Candida albicans* adherence on denturebase acrylic resin. *The journal of prosthetic dentistry*. 2020;123(1).
8. Trevisana E, Menegazzia R, Zabucchia G, Troianb B, Pratob S, Vitaa F, Rapozzic V, Grandolfod M, Borellia V. Effect of methylene blue photodynamic therapy on human neutrophil functional responses. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2019:199.
9. Lennete EH et al. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. Washington, 1985.
10. Nam SH, Lee HW, Cho SH, Lee JK, Jeon YC, Kim GC. High-efficiency tooth bleaching using non-thermal atmospheric pressure plasma with low concentration of hydrogen peroxide. *Journal of Applied Oral Science*. 2013; 21(3): 265-270
11. Campos ICM, et al. Efeito de diferentes agentes clareadores na 30 rugosidade superficial de resinas compostas. *Odontologia Clínico-Científica*. Recife. 2011;10(3):271-276.
12. Bianchi CMPC, Bianchi HA, Tadano T, et al. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Ver Inst Med trop S Paulo*. 2016; 58:17.
13. Silva FC. et al. Effectiveness of photodynamic therapy on *Candida* species isolated from oral samples of children exposed and not exposed to HIV. *Rev Gaúch Odontol, Porto Alegre*. 2016;64(3):271-279.

14. Senna AM, Vieira MMF, Machado-de-Sena RM, Bertolin AO, Nunez SC, Ribeiro MS, Photodynamic inactivation of *Candida* ssp. on denture stomatitis. A clinical trial involving palatal mucosa and prosthesis disinfection, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2018
15. Leitão KVL, et al. Alteração de cor em dentes de estoque após imersão em café e refrigerante. *Full Dent. Sci.* 2017;9(33):66-70.
16. DIAZ GD, Fernandes FHNC, Román CCA et al. Effect of Polishing and Brushing on Removal of Cigarette Smoke Stains from Artificial Teeth. *Int. J. Odontostomat.* 2015;9(3):405-412.
17. Aoun G, Cassia A, Berberi A. Effectiveness of a chlorhexidine Digluconate 0.12% and Cetylpyridinium Chloride 0.05% Solution in eliminating *Candida albicans* Colonizing Dentures: A Randomized clinical in vitro study. *The Journal of Contemporary Dental Practice.* 2015;16(6).
18. Procópio ALF. Efeito antimicrobiano residual e citotoxicidade in vitro de resina acrílica para base de prótese após imersão prolongada em agente de limpeza. Dissertação (Mestrado em ciências odontológicas aplicadas) Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, SP, 2015.

TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão da colorimetria dos grupos estudados

Grupos/Tratamento	Média (ΔE^*)	Desvio padrão	p-valor ¹
NIS	3,665	1,3	
CLX	2,641	0,6	
PDTAM	2,869	1,5	0,0003*
PDTVM	3,993	0,6	

¹ Teste de Kruskal-Wallis

* Diferenças estatísticas significativas

Tabela 2. Teste de comparações múltiplas de Dunn das intervenções estudadas.

Comparações	p-valor ¹
NIS vs. CLX	0,118
NIS vs. PDTAM	0,275
NIS vs. PDTVM	0,930
CLX vs. PDTAM	>0,999
CLX vs. PDTVM	0,001*
PAM vs. PDTVM	0,003*

¹ Teste de Dunn

* Diferenças estatísticas significativas

Tabela 3. Média, desvio padrão e comparações entre os valores de ΔL^* , Δa^* , e Δb^* .

Intervenção	ΔL^*		Δa^*		Δb^*		p-valor ¹
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
NIS	0,1887	3,4	-0,428	0,3	1,89	0,5	0,0029*
CLX	-0,3453	1,6	-0,656	0,1	1,992	0,3	<0,0001*
PDTAM	0,2793	3	-1,09	0,3	0,3373	0,8	0,0002*
PDTVM	-2,887	0,8	-1,835	0,4	1,867	0,5	<0,0001*
p-valor ²	0,001*		<0,0001*		<0,0001*		

¹Teste de Kruskal-Wallis;

*Diferenças estatísticas significativas.

Legenda: DP, desvio padrão.

Tabela 4. Comparações entre as médias das medidas iniciais e finais de L^* , a^* , e b^* em cada intervenção.

Intervenção	L^*			a^*			b^*		
	L_n^* Média±DP ¹	L_1^* Média±DP ¹	p-valor ²	a_n^* Média±DP ¹	a_1^* Média±DP ¹	p-valor ²	b_n^* Média±DP ¹	b_1^* Média±DP ¹	p-valor ²
NIS	-0,348±1,8	-0,159±1,8	0,6788	-0,021±0,2	-0,449±0,1	0,0012*	0,262±0,3	2,153±0,4	<0,0001*
CLX	-1,527±1,7	-1,872±2	0,4212	-0,081±0,1	-0,736±0,1	<0,0001*	-0,076±0,3	1,916±0,5	<0,0001*
PDTAM	-1,535±1,7	-1,256±3	0,4263	0,086±0,2	-1,004±0,3	<0,0001*	0,155±0,4	0,492±0,8	0,002*
PDTVM	-2,175±1,3	-5,062±0,8	<0,0001*	-0,346±0,1	-2,182±0,3	<0,0001*	-0,480±0,3	1,387±0,4	<0,0001*

¹ Desvio padrão

² Teste de Wilcoxon pareado

* Diferenças estatísticas significantes

FIGURAS E GRÁFICOS

Quadro 1. Composição dos grupos experimentais.

Grupos	N	Tratamento
NIS	5	Nistatina 100.000 UI (Teuto, Anápolis, Brasil)
CLX	5	Digluconato de Clorexidina 0,12% (Colgate, São Paulo, Brasil)
PDTAM	5	PDT – Azul de metileno 0,01% (Chimiolux, DMC, Pinhais, Brasil)
PDTVM	5	PDT – Verde malaquita 0,1 mg/ml (Synth, Diadema, Brasil)
CN	5	Sem tratamento (controle negativo microbiológico)