

UNESP - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Juliê Marra

Atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética combinada a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

Araraquara
2011

Marra, Juliê

Atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética combinada a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme./ Juliê Marra. – Araraquara : [s.n.], 2011.

103 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Campagnoni

1. Resinas acrílicas 2. Biofilmes 3. Estomatite sob Prótese
4. Agentes Antibacterianos 5. Materiais dentários I. Título.

JULIÊ MARRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA RESINA ACRÍLICA PARA
BASE PROTÉTICA COMBINADA A UM POLÍMERO
ANTIMICROBIANO SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Carolina Pero

3º Examinador: Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho

4º Examinador: Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza

5º Examinador: Prof. Dr. Sicknan Soares da Rocha

Araraquara, 20 de maio de 2011.

Dados Curriculares

Juliê Marra

Nascimento	29 de maio de 1981 – Goiânia /GO
Filiação	José Marra de Oliveira Maysa Raimundo dos Santos
2000/2003	Curso de Graduação – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2005/2007	Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese – Curso Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2007/2011	Curso de pós-graduação em Reabilitação Oral, área de concentração em Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus amados pais, José e Maysa, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelos exemplos que me fizeram seguir este caminho com coragem e determinação.

*Ao meu querido namorado **Henrique**, por todos os momentos especiais, pelo carinho, companheirismo, respeito e por me incentivar sempre na busca pelos meus sonhos.*

Agradecimentos especiais

Ao querido Professor Marco Antonio Compagnoni,

*exemplo de sabedoria e de professor, agradeço pelo
constante incentivo, pelo carinho, pelas oportunidades, por
toda paciência e tranquilidade para nos ensinar e
principalmente pela amizade e ensinamentos transmitidos.*

Professor, muito obrigada!

Agradecimentos especiais

A **Deus**, pelas bênçãos concedidas, pelas dificuldades superadas e pelos sonhos realizados.

Aos meus irmãos, **Daniel, Maria Cecília, Larissa e Thiago**, pelo apoio, carinho e por compartilharem os momentos importantes de minha vida.

Ao **Tio Sérgio e à Cris**, pelo carinho, apoio, dedicação e por todos os momentos de alegria.

Agradecimentos especiais

A todos os meus **familiares e queridos amigos**, pelo carinho, incentivo e auxílio prestado em todos os momentos da minha vida.

Ao Dr. Élbio, Dra. Sílvia, Isabela, Eduardo, Gabriela, Fatinha, Daniela, Tomás, Teteu e Manu pelo carinho, incentivo, apoio e pelos momentos agradáveis.

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Ana Carolina Pero**, minha querida amiga **Cacá**, pela amizade, pelo convívio agradável, por ter compartilhado todos os momentos desta longa jornada e sempre disposta a me ajudar.

Aos meus queridos amigos **Larissa e André**, pela amizade, por toda ajuda a mim prestada, pelo carinho, pelos ótimos momentos e amizade.

Ao amigo **Raphael**, pela amizade, pela convivência agradável e por todos os auxílios já prestados, em especial, na análise estatística desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Adhemar Colla Ruvolo Filho**, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pela orientação e empenho na realização de etapas fundamentais desta pesquisa.

À Profa. **Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio**, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, por toda orientação nas etapas microbiológicas desta pesquisa.

Às minhas amigas, **Ana Elisa, Ana Paula, Carina, Lilian e Yeon**, pela amizade, carinho, pelo companheirismo, pelas gargalhadas.

Aos queridos amigos **Zeca e Sicknan**, pela amizade, carinho, por toda ajuda prestada, pelas oportunidades e pela ótima convivência.

Às amigas da Pós-Graduação, em especial, à **Amandinha, Camilinha, Amanda Fontana e Carol Chaves**, pela amizade e solidariedade prestada em todos os momentos.

Aos amigos de turma de Pós-Graduação, **Alejandro, Isabella, Laiza, Lívia, Luciano, Luiz Eduardo, Paula e Pierri** pela troca de conhecimentos e pelos momentos agradáveis.

À **Sabrina**, aluna de apoio técnico, pela amizade e por toda ajuda prestada durante a metodologia desta pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica, **Andréia, Gabriela e Norberto** pela amizade, dedicação e auxílios prestados durante o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os **Docentes do Departamento de Materiais Odontológicos**, pelo carinho e ensinamentos fundamentais para o meu crescimento profissional.

Ao técnico do Laboratório de Prótese Total, **Júnior**, pela amizade e por todos os auxílios prestados.

Aos funcionários do **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, meus sinceros agradecimentos pelos anos de convívio agradável, atenção e disponibilidade.

Aos funcionários da Secção de Pós-Graduação desta Faculdade, pela atenção e disponibilidade.

Aos funcionários da Biblioteca desta Faculdade, por toda atenção e auxílios prestados.

Ao diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e à vice-diretora Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos (processo nº 2007/04061-3) e pelo auxílio à pesquisa (processo nº 2008/02602-0) concedidos para o desenvolvimento deste estudo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Sumário

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO DA LITERATURA.....	24
PROPOSIÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODO.....	51
RESULTADO.....	69
DISCUSSÃO.....	75
CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE.....	98

Marra J. Atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética combinada a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Resumo

Por ser considerada um ambiente propício para proliferação de microrganismos bucais e formação de biofilme, possibilitando o aparecimento de estomatite protética, a adição de um polímero com ação antimicrobiana à resina acrílica poderia favorecer a saúde bucal do paciente edentado e torná-la menos suscetível à formação de biofilmes. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica termopolimerizável para base protética combinada ao polímero antimicrobiano poli(2 tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) sobre formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Trinta espécimes de formato circular foram confeccionados a partir da resina acrílica termopolimerizável (Lucitone 550) e divididos em três grupos de acordo com as diferentes concentrações de PTBAEMA 0, 10 e 25%. Os espécimes foram inoculados e incubados a 37°C por 48h. Após esse período, cada espécimes foi transferido para tubos contendo solução salina. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas da suspensão resultante e alíquotas dessas diluições foram semeados em placas de Petri e incubadas a 37°C por 48h. Os dados obtidos foram transformados em $\log(\text{UFC}+1)/\text{ml}$ e analisados pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Os resultados demonstraram que o grupo contendo 25% de PTBAEMA

inibiu completamente a formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*. Uma redução significativa na contagem de log(UFC+1)ml de *S. aureus* (P=0,001) e *S. mutans* (P=0,001) para o grupo contendo 10% de PTBAEMA foi observada quando comparada aos valores encontrados nos respectivos grupos controle. Para *C. albicans* não foi encontrada diferença significante entre grupos contendo PTBAEMA e o grupo controle (P=0,079). Conclui-se que a resina acrílica Lucitone 550 contendo 10% e 25% de PTBAEMA apresentaram, respectivamente, um efeito bacteriostático e bactericida na formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*. Entretanto não teve efeito significante na formação de biofilme de *C. albicans*.

Palavras-chave: Resinas acrílicas; Biofilmes; Estomatite sob Prótese; Agentes antibacterianos; Materiais dentários.

Marra J. Antimicrobial activity of a denture base acrylic resin combined with a biocide polymer on biofilm formation [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Abstract

Denture base acrylic resins have been shown to be reservoirs for microorganisms and are a potential to support the formation of biofilm, which may result in the development of denture stomatitis. Thus, the addition of a polymer with antimicrobial activity to the acrylic resin could inhibit biofilm growth on denture base. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of an acrylic resin combined with antimicrobial polymer poly (2-tert-butylaminoethyl) methacrylate (PTBAEMA) to inhibit biofilm formation of three species of microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*). Thirty discs of a heat-polymerized acrylic resin (Lucitone 550) were produced and divided into three groups, according to the concentration of PTBAEMA: 0% (control), 10% and 25%. The specimens were individually inoculated with appropriate media containing one of the tested microorganisms and incubated for 37°C for 48h under aerobic or anaerobic conditions. After incubation, each specimen was transferred to sterile tube containing sterile distilled water. Replicate aliquots of resultant suspensions were plated at dilutions for 48h at 37°C. After incubation, the mean microbial counts were expressed as log (CFU + 1)/mL and analyzed statistically with $\alpha=.05$. The results showed that the group containing 25% of PTBAEMA completely inhibited biofilm formation

of *S. aureus* and *S. mutans*. A significant reduction in count of log (CFU +1) ml of *S. aureus* (P=0.001) and *S. mutans* (P=0.001) was observed for the group containing 10% PTBAEMA when compared to respective control groups. For *C. albicans*, differences were not significant between groups containing PTBAEMA and control group (P=0.079). It was concluded that 10% and 25% of PTBAEMA showed, respectively, a bacteriostatic and bactericidal effect in biofilm formation of *S. aureus* and *S. mutans*. However, had no significant effect on biofilm formation of *C. albicans*.

Keywords: Acrylic resins; Biofilms; Denture stomatitis; Anti-bacterial agents; Dental materials.

Introdução

Introdução

O decréscimo das taxas de mortalidade, associado às melhorias nas condições de saneamento básico, aos progressos tecnológicos e aos avanços dos estudos no campo da saúde propiciaram em uma participação cada vez mais significativa dos idosos na população, resultando num processo de envelhecimento populacional rápido e intenso^{38,70}.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a projeção para 2025 é de que a proporção de idosos no Brasil esteja em torno de 15%, o que implicará na necessidade de uma série de decisões em termos políticos e principalmente relacionadas à saúde⁷⁰.

Na odontologia, medidas preventivas culminaram em um declínio de dentes perdidos em indivíduos adultos, entretanto o número de edentados ainda é expressivo. Um levantamento das condições de saúde bucal da população brasileira, realizado em 2000, mostrou que 56,0% e 32,4% dos idosos necessitavam de próteses inferior e superior, respectivamente, sendo a prótese total a que apresentava maior necessidade, entre os procedimentos de reabilitação oral⁵¹.

Apesar do tratamento com próteses totais convencionais ainda ser o meio mais comum de tratamento de pacientes desdentados totais⁴⁴, essas próteses podem alterar a microbiota bucal, acarretando em uma proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos e proporcionar um meio favorável ao desenvolvimento de infecções¹⁷. A presença de rugosidades e poros superficiais na base protética de resina acrílica favorecem a proliferação e sobrevivência de

microrganismos bucais e formação de biofilme microbiano^{53,68}. Apesar da *Candida albicans* ser a espécie mais comumente isolada da mucosa palatina e da superfície protética, outras são frequentemente encontradas, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*, além de bactérias como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* e eventualmente espécies extra-orais tal como *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. ou *Enterobacteriaceae*^{2,17,32,56,65,69,74,75,81,83}.

A colonização de microrganismos nas superfícies das próteses pode induzir uma resposta inflamatória crônica, caracterizada pela presença de área eritematosa na mucosa bucal que mantém contato com a prótese, denominada estomatite protética^{8,12,15,88}. Esse processo patológico é considerado como uma das lesões bucais mais comumente observadas na cavidade oral e afeta uma grande porcentagem dos usuários de próteses removíveis^{42,69,89}.

Embora a etiologia da estomatite protética seja considerada multifatorial, a infecção por *Candida* spp., especialmente *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico^{7,24,26}. Idade, gênero, deficiências nutricionais, antibióticos de amplo espectro, imunossupressores e alterações no mecanismo imunológico também são considerados como fatores etiológicos dessa patologia^{30,85}. Fatores locais associados à prótese como pobre higiene bucal, trauma local causado pela prótese, uso contínuo da prótese e alterações no pH da saliva também são predominantes no desenvolvimento da estomatite protética^{21,66}.

Os tratamentos direcionados à estomatite protética são variados, podendo incluir terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica,

cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses, reparo ou substituição das próteses^{20,52,88}. Entretanto, os medicamentos tópicos são facilmente eliminados pela saliva e pela movimentação da língua, fazendo com que este tipo de tratamento seja prolongado^{13,39}. Já a utilização dos medicamentos antifúngicos sistêmicos apresentam como desvantagem a resistência das espécies e o fato de não erradicarem os microrganismos que colonizam a prótese, tornando a recorrência da infecção frequente^{49,72}. Estes fatos sugerem, então, que o tratamento da estomatite protética, deva ser direcionado primariamente à prótese, uma vez que as colônias de *Candida* spp. e bactérias presentes na superfície da resina acrílica podem causar reinfecção da mucosa do paciente^{24,42}.

Entre os diversos métodos de limpeza e desinfecção das próteses, a escovação associada a algum tipo de detergente, sabão ou dentifrício é o método mecânico-químico mais utilizado pelos usuários de próteses^{14,25}. No entanto, uma avaliação do nível de higiene das próteses de pacientes idosos revelou que 82% deles eram incapazes de realizar uma adequada limpeza das suas próteses³¹. Isso normalmente está associado à capacidade visual reduzida e destreza manual limitada, o que resulta em uma higienização menos eficiente³³.

Uma alternativa comumente utilizada na desinfecção de próteses é a sua imersão em soluções químicas, como glutaraldeído a 2%, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, iodóforo, álcool e clorexidina^{1,11,46}. Entretanto, essas soluções apresentam algumas desvantagens, como corrosão dos componentes metálicos e descoloração da resina acrílica após imersão em hipoclorito de sódio, redução da

resistência à flexão após imersão em álcool, a baixa efetividade antimicrobiana dos iodóforos e o manchamento das bases protéticas de resina acrílica pela utilização de soluções à base de clorexidina^{9,10,22,23,54,63}.

Na tentativa de reduzir ou evitar a proliferação de microrganismos na superfície das próteses, diversos autores investigaram a incorporação de agentes antimicrobianos como nistatina, miconazol, fluconazol, itraconazol, clorexidina, triclosan, zeólito de prata e zinco e dióxido de titânio em reembasadores temporários, condicionadores de tecido e em resinas acrílicas^{16,19,20,27,28,43,55,67,78,86,87,89}. Entretanto, uma vez que o efeito antimicrobiano desses materiais se dá pela liberação gradual dos compostos³ alguns estudos têm demonstrado que esses agentes perdem as propriedades antimicrobianas com o tempo, podem levar a efeitos tóxicos na mucosa do paciente, bem como aumentar a deterioração do material³⁶.

Como alternativa, alguns estudos têm buscado uma redução na suscetibilidade de polímeros odontológicos à adesão microbiana, através do tratamento superficial com plasma⁹¹⁻⁹³, vernizes⁷⁶ e ainda pela incorporação de zeólitos antimicrobianos^{19,48,55}, dióxido de titânio (TiO₂)^{4,78}, nanopartículas de prata^{29,50}. Apesar destas tentativas terem se mostrado promissoras no desenvolvimento de biomateriais que promovam a diminuição da adesão de microrganismos, grande parte dos compostos incorporados também são liberados com o passar do tempo, levando à perda das propriedades antimicrobianas do material e ainda podem afetar negativamente as propriedades físicas e mecânicas do polímero^{19,61}.

Diante disso, alguns autores buscaram desenvolver polímeros odontológicos com propriedades antimicrobianas sem depender da liberação de agentes. Imazato et al.³⁶ e Pesci-Bardon et al.^{64,65} incorporaram compostos de amônio quaternário, em que ocorre uma ligação química covalente com polímero odontológico, tornando-os fortemente integrados e sua ação se dá pelo contato dos microrganismos com o biocida, e não pela liberação dos seus componentes³⁷.

De maneira semelhante, pode-se destacar o polímero antimicrobiano poli(2 tert-butilaminoetil) metacrilato (PTABEMA) que se caracteriza como uma substância policatiônica e atua na permeabilidade da membrana celular causando substancial dano a essa membrana e com isso resultando na morte do microrganismo^{34,84}. Por apresentar baixa toxicidade e não causar resistência bacteriana, esta substância vem sendo incorporada a tubos de polietileno, bem como a aço inoxidável com intuito de eliminar ou reduzir a aderência de microrganismos nas superfícies desses materiais e resultados promissores têm sido observados^{35,77}. Este polímero apresenta grupos amina livres em uma das extremidades da sua cadeia polimérica que lhe conferem uma alta atividade antimicrobiana^{57,58}. Dessa forma, o mero contato do microrganismo com a superfície contendo esta substância é suficiente para promover um efeito biocida⁷⁷.

Com intuito de desenvolver uma alternativa viável para reduzir ou impedir o crescimento de microrganismos na superfície da prótese e possibilitar melhorias na qualidade de vida de usuários de próteses removíveis, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica

termopolimerizável para base protética combinada ao polímero antimicrobiano poli(2 tert-butilaminoetil) metacrilato sobre a formação, in vitro, de biofilme de espécies comumente associadas à estomatite protética.

Revisão da Literatura

Revisão da literatura

Em 1983, Lamb, Martin⁴¹ avaliaram, in vitro e in vivo, se a difusão da clorexidina de uma resina acrílica autopolimerizável seria suficiente para prevenir ou inibir candidose na mucosa palatina. No teste in vitro, os grupos experimentais foram obtidos com concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de acetato de clorexidina. Após a confecção, os espécimes foram imersos em água e periodicamente transferidos para recipientes contendo água. Para avaliar a ação fungicida, a água contendo clorexidina liberada de cada período foi introduzida em orifícios de placa de Petri previamente inoculada com *C. albicans*. Após um período de incubação por 72 horas à 30°C, foram mensurados os halos de inibição formados. Observou-se que na terceira semana de teste, apenas os grupos com concentração de 7,5% e 10% de acetato de clorexidina mantiveram atividade antifúngica. Para o teste in vivo, a partir da concentração de 7,5% foram confeccionadas placas e instaladas no palato de ratos Wistar nos quais foi induzido o desenvolvimento de candidose. Após sacrifícios dos animais, a avaliação dos tecidos palatinos dos ratos demonstrou que a presença da clorexidina na placa preveniu a formação de biofilme bem como manteve íntegro o epitélio. Entretanto, animais com placas sem clorexidina apresentaram epitélio palatino hiperplásico infiltrado com células inflamatórias e com penetração de hifas fúngicas em sua superfície.

El-Charkawi et al.²⁸, em 1994, avaliaram a atividade antimicrobiana, as propriedades mecânicas e a composição química de três materiais reembasadores (Acrostone, Raplon e Ufi-gel) após a incorporação de dois agentes antimicrobianos (nistatina e polinoxilina). Os resultados obtidos demonstraram que a adição de nistatina nas concentrações de 3%, 5% e 10% apresentou efeito antimicrobiano contra *Candida albicans* por 4, 16 e 32 semanas respectivamente, sendo a duração do efeito antimicrobiano diretamente proporcional à concentração de nistatina. As propriedades mecânicas avaliadas como tensão de tração, de compressão e de cisalhamento não foram afetadas pela incorporação de nistatina. Entretanto, a incorporação de polinoxilina apresentou efeito antimicrobiano apenas em altas concentrações 40%, 50% e 60% por um curto período de tempo 6, 8 e 28 dias, respectivamente, e demonstrou efeitos deletérios às propriedades mecânicas avaliadas. Por meio de espectroscopia de infravermelho, observou-se que não houve interação química entre os materiais reembasadores e os agentes antimicrobianos testados. Concluíram por fim, a importância de selecionar agentes antimicrobianos que ao serem incorporados aos materiais reembasadores não comprometam as suas propriedades mecânicas.

Ainda em 1994, Truhlar et al.⁸⁶ avaliaram a atividade antifúngica de dois materiais reembasadores (Visco-gel e Lynal) contendo diferentes concentrações de nistatina (0 U, 100.000 U, 300.000 U, 500.000 U e 1.000.000 U) por um período de 14 dias em ambiente aquoso e não aquoso. Os resultados demonstraram que o reembasador Visco-gel contendo nistatina exibiu maior

atividade fungicida quando comparado ao Lynal contendo nistatina. Os reembasadores contendo nistatina apresentaram uma rápida redução da atividade antifúngica entre os dias 0 e 2, seguida de um platô em que foram gradativamente reduzindo a atividade antifúngica. Para manter um adequado nível de atividade antifúngica em meio aquoso a quantidade necessária de nistatina observada foi de 1.000.000 U. Os reembasadores demonstraram uma redução na atividade antifúngica proporcional ao tempo de exposição à água.

Imazato et al.³⁶, em 1994, investigaram a atividade antimicrobiana do monômero brometo de metacrilóiloxidodecilpiridínio (MDPB) incorporado a uma compósito odontológico, a liberação dos seus componentes antimicrobianos e a influência nas propriedades mecânicas. A concentração inibitória mínima (CIM) do monômero frente a diversas espécies do gênero *Streptococcus* foi determinada através de diluições seriadas, sendo encontrado para o *S. mutans* o valor de 15,6 µg/ml, semelhante ao triclosan (15,6 µg/ml). Através do teste de difusão em disco utilizando espécimes contendo 0 (controle), 0,1 e 0,2% de MDPB para avaliar o efeito inibitório contra o crescimento de *S. mutans* observou-se a ausência de formação de halos de inibição. Entretanto, o crescimento bacteriano sob os espécimes foi inibido nos grupos teste, sendo maior no grupo 0,2%. O acúmulo de biofilme nos espécimes contendo o MDPB apresentou menores valores quando comparados ao grupo controle. Por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), observou-se que após imersão dos espécimes em água, etanol 100% e n- heptano por 1, 7, 30, 60 e 90 dias, não houve liberação de MDPB não

polimerizado em nenhum dos tempos analisados. Não houve diferença significativa entre o controle e os espécimes contendo o monômero com relação as propriedades mecânicas avaliadas através de testes de força compressiva, tensões diametral e flexural após 1, 30, 60 e 90 dias de imersão em água, bem como o módulo flexural. Houve diferença significativa no módulo flexural para o grupo 0,2% após 1 e 30 dias, que apresentou maiores valores em relação ao controle.

Em 1997, Nikawa et al.⁵⁵ incorporaram zeólito de prata (Zeomic® AJ-10D) a dois condicionadores teciduais (GC Soft Liner e Coe Comfort) nas concentrações de 0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% e avaliaram a atividade antimicrobiana e a dureza desses materiais modificados. Os resultados obtidos demonstraram que o efeito inibitório do crescimento de *Candida albicans* foi dose-dependente, uma vez que os melhores resultados foram obtidos para o grupo com concentração de zeólito de prata de 5%. A propriedade física avaliada não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e aqueles que continham as diferentes concentrações de zeólito de prata. Os autores concluíram que a adição de zeólito de prata a condicionadores teciduais poderia auxiliar no controle do acúmulo de placa bacteriana frequentemente observados nas próteses.

Também em 1997, Matsuura et al.⁴⁸ pesquisaram o efeito antimicrobiano de materiais reembasadores após a incorporação de zeólito de prata (Zeomic® AJ10N). Cinco condicionadores de tecido foram selecionados (Visco-gel, GC Soft-Liner, Fitt, SR-Ivoseal e Shofu Tissue Conditioner) e 2% de

zeólito de prata foram incorporados em relação ao pó destes materiais. Foram confeccionadas amostras de 10 x 10 x 2,5 mm de tamanho, divididas em amostras contendo zeólito de prata e amostras sem zeólito de prata (controle). O efeito antimicrobiano dessas duas amostras foi avaliado de acordo com a porcentagem de células viáveis (UFC), em suspensão microbiana com ou sem imersão em saliva artificial por quatro semanas. O limite que caracterizava o efeito antimicrobiano foi determinado em 0,1% de células viáveis. Por meio dos resultados obtidos, os autores concluíram que os materiais reembasadores que continham Zeomic® AJ10N apresentaram efeito antimicrobiano sobre *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* por até quatro semanas.

Chow et al.²⁰ (1999) incorporaram diferentes antifúngicos (nistatina, fluconazol e itraconazol) em três condicionadores de tecido e investigaram o método de liberação destas substâncias. Após a incorporação das drogas nas concentrações 1, 3, 5, 7, 9 e 11 % nos condicionadores de tecido, estes foram introduzidos em orifícios realizados em placas de Petri previamente inoculadas com *C. albicans*. Após incubação por diferentes períodos de tempo, realizou-se a mensuração do halo de inibição formado. Os resultados demonstraram que os orifícios contendo apenas condicionadores de tecido sem incorporação de antifúngicos não demonstraram inibição efetiva do crescimento dos microrganismos. O pico de atividade dos antifúngicos se deu entre 65 e 89 horas, seguida de um platô. O itraconazol apresentou maior atividade fungicida que o

fluconazol, enquanto que a nistatina apresentou a menor atividade. A concentração mais efetiva para quase todas as combinações foi de 5%. Os autores concluíram que para o tratamento da estomatite protética recomenda-se a combinação de itraconazol a 5% com Coe Soft ou Fitt e devido ao pico da atividade antifúngica ser de três dias, sugere-se a substituição deste material o mais breve após este período.

Lefebvre et al.⁴³ em 2001, investigaram o efeito antimicrobiano e a citotoxicidade de espécimes de um material reembasador resiliente com a adição de um composto que continha triclosan. Espécimes circulares (5 x 1 mm) foram confeccionados e divididos em grupos com e sem a incorporação de Microban. Para avaliação da citotoxicidade, fibroblastos de ratos foram devidamente cultivados, distribuídos em poços de microplacas, onde foram posicionados os espécimes. Foi medida a atividade da desidrogenase succínica por meio do teste colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que reflete a atividade mitocondrial e a produção energética celular. Para determinar o efeito do Microban no crescimento de *C. albicans*, espécimes foram colocados em placas e imersos por uma solução contendo cepas de *C. albicans* e incubados a 37°C por 48 horas. Os espécimes foram lavados para remoção das células fracamente aderidas, em seguida agitados por 5 minutos em ultra-som para remoção dos microrganismos na superfície. Diluições seriadas foram realizadas, semeadas a 37°C por 24 horas e o número de colônias contado. Os resultados demonstraram não que não houve diferença significativa entre o PermaSoft sem

Microban e PermaSoft com Microban. Concluiu-se que a adição de Microban na concentração 1/80 não alterou a citotoxicidade, mas também não reduziu a adesão de *Candida albicans* na superfície do material testado.

Park et al.⁶², em 2003, incorporaram ácido metacrílico a uma resina acrílica para base protética e avaliaram a hipótese de que essa superfície carregada de cargas negativas reduziria a adesão de *C. albicans*. O ácido metacrílico foi incorporado nas concentrações de 0%, 5%, 10% e 20% em substituição ao monômero metilmetacrilato (MMA) da resina acrílica. Os espécimes contendo as diferentes concentrações de ácido metacrílico foram colocados em suspensões contendo *C. albicans* e as células aderidas foram coradas com cristal violeta. A superfície total de *C. albicans* aderidas foi examinada através de imagem do computador com aumento de 25 x. A porcentagem de área de superfície de *C. albicans* aderida foi calculada e comparada ao grupo controle. Os resultados demonstraram que quanto maior a proporção de ácido metacrílico incorporado a resina acrílica, menor a quantidade de *C. albicans* aderida. Segundo os autores, esses resultados reforçam o papel da interação eletrostática na adesão, e apresenta um método eficaz de reduzir a adesão de *C. albicans* nas superfícies de PMMA através da alteração da carga de superfície de biomateriais poliméricos.

Em 2004, Pesci-Bardon et al.⁶⁴ desenvolveram um protocolo para avaliar as propriedades anti-sépticas de um composto a base de amônio quaternário polimerizado a uma resina acrílica utilizada para base de prótese.

Discos de resina acrílica foram confeccionados contendo composto a base de amônio quaternário Poly 202063A nas proporções de 0% (controle), 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50% em relação ao polímero da resina acrílica. As propriedades anti-sépticas foram testados contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, utilizando três condições diferentes (teste A, B e C). No teste A, os discos de resina foram inicialmente embebidos em grandes volumes da suspensão microbiana. Em seguida, um protocolo de diálise original foi então desenvolvido de maneira que pequenos volumes da suspensão microbiana simulavam o biofilme protético. No teste B, discos e suspensão microbiana foram introduzidos em recipiente e dialisados contra solução tampão estéril. E no teste C, discos e solução tampão estéril foram introduzidos em recipiente e dialisados contra suspensão microbiana. Um efeito bactericida foi observado contra *E. coli* e *S. aureus* (<0,1% de células viáveis na suspensão bacteriana inicial). Um efeito fungistática dose-dependente foi observado contra *C. albicans*. Concluiu-se que o protocolo apresentado mostrou que o composto de amônio quaternário permaneceu eficaz após a polimerização da resina acrílica para base de prótese a resina acrílica e demonstrou propriedades bactericidas e fungistáticas na concentração de 2%, que poderia possibilitar a obtenção de próteses removíveis com propriedades anti-sépticas intrínsecas.

Em 2005, Yildirim et al.⁹¹ investigaram se o tratamento da superfície da resina acrílica com descarga de plasma aumentaria a adesão de *C. albicans*, uma vez que esta técnica melhora o molhamento da superfície. Foram

confeccionados espécimes em resina acrílica e divididos em três grupos: controle (superfície sem modificação), grupo exposto a descarga de plasma em O₂ a uma atmosfera de 50 w (O₂50) e grupo exposto a descarga de plasma em O₂ a uma atmosfera de 100 w (O₂100). Em cada grupo foi medido o ângulo de contato antes dos espécimes serem imersos em saliva, e após contato com a saliva. A adesão de *C. albicans* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura após incubação a 37°C por 2 horas. Observou-se maior molhabilidade, caracterizada por um menor ângulo de contato para o grupo O₂100. Os espécimes com superfícies sem modificação apresentaram menor adesão de *C. albicans* quando comparados àqueles tratados com plasma. Conclui-se que o aumento da molhabilidade da superfície de resinas acrílicas por descarga de plasma em O₂ aumentou a adesão de *C. albicans*.

Pesci-Bardon et al.⁶⁵ (2006) determinaram a porcentagem de um composto contendo amônio quaternário polimerizado a resina acrílica necessária para se obter propriedades anti-sépticas. Discos de resina acrílica foram confeccionados contendo o composto de amônio quaternário nas concentrações de 0%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%. Após polimerização, os discos de resina foram esterilizados e armazenados em saliva artificial por 4 semanas para liberação do monômero residual. Foram realizados experimentos com suspensão de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os dados foram coletados e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado. O limite que caracterizava o efeito antimicrobiano

foi determinado em 0,1% de células viáveis. Os resultados demonstraram que os espécimes de resina contendo 2% do composto de amônio quaternário apresentaram efeito bactericida para *S. aureus* e *E.coli* e para *P. aeruginosa* a partir de 10%. Observou-se que somente os discos de resina acrílica contendo 50% do composto de amônio quaternário apresentaram efeito fungicida contra *C. albicans*. Conclui-se que 2% do composto de amônio quaternário polimerizados com uma resina acrílica exibiu propriedades anti-sépticas, após 4 semanas de período de imersão em saliva artificial, o que poderia melhorar a saúde oral dos pacientes geriátricos.

Também em 2006, Taweechaisupapong et al.⁸² determinaram os efeitos de várias concentrações do extrato de *Streblus asper* (SAE), uma planta medicinal, na inibição da adesão de *Candida albicans* na superfície de resina acrílica. A adesão de *Candida albicans* na superfície da resina acrílica foi determinada após a exposição ao SAE por 1, 15, 30, 60, 120 e 180 min e analisada pelo método colorimétrico com sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT). Os resultados desse estudo demonstram uma redução significativa na adesão de *Candida* após 1min de exposição para concentração de 62.5mg/ml de SAE. Conclui-se que a exposição de *Candida albicans* a concentrações de SAE reduziu a capacidade de adesão das leveduras na superfície da resina acrílica, possibilitando a prevenção da este estomatite protética.

Thein et al.⁸³ (2006) avaliaram, o efeito de oito espécies de bactérias aeróbias e anaeróbias presentes na cavidade bucal sobre a formação do biofilme de *C. albicans*. Foram preparadas suspensões de contendo as diferentes espécies formadoras de biofilme e realizado um protocolo de formação do biofilme interagindo com a *C. albicans*. Em seguida, quantificou-se o número de células viáveis e avaliou a formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados encontrados mostraram culturas com as maiores concentrações de cada uma das bactérias resultaram em uma redução consistente na contagem de leveduras. O biofilme foi reduzido na presença de maior concentração de *E. coli*, entretanto não foi influenciado pelos *Streptococcus*. Conclui-se que, de maneira quantitativa e qualitativa, as bactérias modulam a formação de biofilme *C. albicans* em ambientes mistos de espécies como a cavidade oral.

Lenoir et al.⁴⁵, em 2006, incorporaram o biocida poli (2-tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) a um polietileno de baixa densidade (LDPE), através de um processo convencional de transformação de polímeros (extrusão). Neste estudo, os autores avaliaram a atividade antibacteriana de amostras de LDPE contendo 10% em massa de PTBAEMA frente à *Escherichia coli*. Para isso, amostras (0,5 x 0,5 cm) de LDPE modificado com PTBAEMA foram colocadas em tubos contendo solução salina estéril e obtidas suspensões nas concentrações de 0.2, 0.3 e 0.4 g/ml. Em seguida, alíquotas da solução do microrganismo, contendo 10⁸ células/mL, foram inoculadas a essas suspensões de

LDPE modificado. Em intervalos regulares de tempo (20, 60 e 120 minutos) alíquotas desta suspensões foram removidas e realizadas diluições em série (até 10^5) e semeadas em placas de Petri que foram incubadas a 37 °C durante à noite. Após a incubação, o número de células viáveis foi determinado. Também avaliou-se a atividade antibacteriana pelo método da difusão em ágar, em que amostras de LDPE puro e LDPE modificado com PTBAEMA foram colocadas sobre placas de Petri previamente inoculadas com aproximadamente 1×10^6 células de *E. coli*. Para avaliar as alterações morfológicas ocorridas nas células bacterianas foram realizadas microscopia de transmissão e varredura. Os resultados demonstraram que 0,4g do material modificado por milímetro foi capaz de eliminar todas as bactérias quando em contato com o inóculo por 120 minutos. No método de difusão em ágar observou-se ausência de halo de inibição em torno das amostras de LDPE modificado com PTBAEMA, o indica que nenhum composto ativo foi liberado. A microscopia eletrônica de transmissão e varredura mostraram marcantes alterações estruturais nas membranas das bactérias expostas ao LDPE modificado com PTBAEMA. Finalmente, os autores concluíram que o modo de ação do PTBAEMA é semelhante ao antibiótico polimixina que se liga fortemente aos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas e provocam o deslocamento de íons Ca^{2+} e /ou Mg^{2+} da membrana externa da bactéria, conseqüentemente acarretando na desorganização da membrana, lise das células, que resulta na morte das bactérias.

Uma vez que implantes ortopédicos são frequentemente acometidos por processos infecciosos e o principal patógeno isolado é o *S. aureus*, Ignatova et al.³⁵, em 2006, resolveram avaliar o efeito do recobrimento superficial de um aço inoxidável com poli(TBAEMA) e outros copolímeros de TBAEMA sobre a adesão de *S. aureus*. Para isso, superfícies de aço inoxidável (2 cm²) foram esterilizadas e colocadas em placas. Em seguida, uma alíquota de uma suspensão contendo $1,5 \times 10^8$ células de *S. aureus* foi pipetada por toda superfície do aço inoxidável. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 37°C por 1 hora. O substrato em aço inoxidável foi retirado da placa, lavado e agitado por 5 segundos em ultra-som em um tubo contendo 5 mL de Tryptic Soy Broth (TSB) com 5% Tween. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas desta solução e a semeadura em placas de Petri que foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, o número de colônias foi determinado. Os resultados demonstraram que entre as superfícies de aço inoxidável testadas, as revestidas por poli(TBAEMA-co-PEOMA), poli(TBAEMA) e poli (TBAEMA-co-AA) reduziram a adesão de *S. aureus* quando comparadas ao aço inoxidável não revestido (controle). Os autores concluíram que estes achados são de grande interesse para implantes médicos e em outras aplicações ortopédicas.

Seyfriedsberger et al.⁷⁷ (2006) investigaram as propriedades antimicrobianas de um polietileno (LLDPE) contendo diferentes concentrações 0; 1,5; 3 e 5% em massa do polímero poli (2-tert-butilaminoetil) metacrilato (neste estudo denominado pelos autores como TBAM). A atividade antimicrobiana foi

avaliada 24 horas após o contato das amostras com as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Também foi investigada a formação de biofilme sobre as superfícies do polietileno através da mensuração de adenosina tri-fosfato (ATP) após 8, 12 e 16 semanas de incubação. Mensurações de ATP evidenciam a quantidade de microrganismos viáveis presentes no biofilme aderido. Foram analisadas a interação química entre o LLDPE e o TBAM através da microscopia eletrônica de transmissão, de medidas eletrocínéticas (obtem informações sobre a superfície do espécime) e propriedades mecânicas. Observou-se que o número de UFC/ml de *S. aureus* após 24 horas de contato entre microrganismo e todos grupos contendo TBAM foi reduzido a zero. Para *E. coli*, apenas o grupo com concentração 5% de TBAM reduziu para zero o número de UFC/ml. Após 12 e 16 semanas de incubação que se detectou a formação de biofilme. Foi observada a dispersão heterogênea das partículas de TBAM na matriz de LLDPE, e não foram constatados prejuízos às propriedades mecânicas avaliadas de acordo com aumento da concentração de TBAM.

Thomassin et al.⁸⁴ (2007) incorporaram o polímero poli(2-tertilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) a um polipropileno (PP) e avaliaram suas propriedades antimicrobianas frente a espécie de *E. coli*. Para isso, amostras de PP contendo 12,5 e 25% em massa de PTBAEMA foram inoculadas com uma solução contendo 10^8 células/mL de *E. coli*. Em intervalos regulares de tempo (20, 60 e 120 minutos), alíquotas desta solução foram removidas e realizadas diluições em série (até 10^5) e semeadas em placas de Petri que foram incubadas a 37 °C

durante à noite. Após a incubação, o número de células viáveis foi determinado. Os resultados demonstraram uma atividade antibacteriana de longa duração, que os autores justificaram como sendo em consequência da ligação das cadeias do PTBAEMA ao polipropileno, o que o impediu de ser liberado.

Manfredi et al.⁴⁷ (2007) avaliaram a atividade fungicida de um decapeptídeo sintético (KP) frente a células de *C. albicans* aderidas a resina acrílica. A atividade antifúngica do KP foi avaliada pela contagem de UFC de *C. albicans* aderidas aos discos de resina acrílica previamente confeccionados. *C. albicans* foi inoculada na superfície jateada dos discos de resina acrílica e colocados dentro de uma placa de Petri, para incubação dos espécimes. Após incubação, os discos foram lavados e colocados em novas placas de Petri, 5 ml de água estéril contendo 100 µg/mL de KP foi adicionada e em seguida novamente incubados. No grupo contendo KP, observou-se uma redução de mais de 90% no número de células de *C. albicans* quando comparado ao grupo controle. Os resultados deste estudo sugerem um potencial efeito do KP sobre células de *C. albicans* aderidas à superfície de próteses.

Também em 2007, Shibata et al.⁷⁸ avaliaram a atividade antifúngica e propriedades mecânicas de uma resina acrílica contendo dióxido de titânio coaptado com apatita (Ap-TiO₂). Foram confeccionados espécimes em resina acrílica nas quais o polímero foi substituído por Ap-TiO₂ nas concentrações de 1, 5 e 10%. Os espécimes foram incubados numa solução com *C. albicans* para

avaliar a atividade antifúngica. Foram realizados os testes de resistência flexural e módulo flexural. Como resultado, foi possível observar uma diminuição significativa na viabilidade celular nas superfícies das resinas acrílicas para os grupos contendo 5 e 10% de ambos os compostos. Quanto a resistência a flexão, observou-se uma diminuição dos valores de acordo com aumento da concentração de Ap-TiO₂. Alguns grupos não atingiram os valores recomendados pela norma ISO 1567 (> 65 MPa). Apesar de o módulo flexural também ter variado, os valores permaneceram dentro dos limites preconizados pela mesma norma (> 2000 MPa). Logo, concluíram que a resina acrílica com 5% de Ap-TiO₂ pode exercer efeitos antifúngicos e manter as propriedades mecânicas adequadas para uso clínico.

Silva et al.⁷⁹ (2008) avaliaram o efeito do fluconazol, nistatina e gel orabase de própolis sobre a superfície de resina acrílica. Após a confecção de espécimes com resina acrílica polimerizável em banho de água ou com energia de microondas, avaliou-se a rugosidade de superfície, energia livre de superfície e dureza. Em seguida, os espécimes foram imersos nos diferentes antifúngicos durante 14 dias e todas as variáveis foram analisadas novamente. Os resultados mostraram que ambas as resinas aumentaram a rugosidade de superfície e energia livre de superfície, mas não diferiram entre si. Os grupos tratados com própolis mostraram valores maiores de rugosidade de superfície dos demais. Com relação a rugosidade e energia livre de superfície não foram encontradas diferenças entre as resinas acrílicas e entre fluconazol e nistatina. Concluiu-se que o própolis induziu

modificações na superfície da resina acrílica, aumentando a rugosidade, fator que poderá facilitar a adesão de microrganismos.

Casemiro et al.¹⁹ em 2008, avaliaram a atividade antimicrobiana de resinas acrílicas (Onda-cryl, QC-20 e Lucitone 550) contendo diferentes concentrações de zeólito de zinco e prata, e se essa incorporação alteraria a resistência à flexão e ao impacto das resinas. Cinquenta espécimes foram confeccionados e divididos em 5 grupos, de acordo com a quantidade de zeólito de zinco e prata adicionados: 0% (controle), 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10% em proporção ao polímero da resina acrílica. Para avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se o método da difusão em ágar e cepas de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. Os resultados demonstraram que a adição de 2,5% de zeólito de zinco e prata exibiu uma atividade antimicrobiana contra todas as cepas avaliadas. A resistência à flexão diminuiu significativamente a partir da concentração de 2,5% para as resinas QC-20 e Lucitone 550 e de 5% para a resina Onda-Cryl. A resistência ao impacto também diminuiu significativamente a partir de 2,5% para a resina Lucitone, enquanto para as resinas QC-20 e Onda-Cryl somente a partir de 5%. Os autores concluíram que a incorporação de zeólito de zinco e prata pode ser uma alternativa viável para a redução de microrganismos nas resinas acrílicas para base protética, entretanto as propriedades mecânicas podem ser negativamente afetadas dependendo da porcentagem de zeólito de zinco e prata incorporada.

Park et al.⁶⁰ (2008) investigaram dois métodos para reduzir a adesão de *C. albicans* na superfície de resina acrílica para base protética através da modificação das características da superfície da resina acrílica, pela incorporação de radicais polares e pela aplicação de um polímero auto-aderente. Três grupos foram testados: controle (PMMA puro), PMMA modificado com 16% de ácido metacrílico, PMMA tratada com um polímero auto-aderente. Os espécimes foram confeccionados e foram incubados com suspensão de *C. albicans* por 2, 4, 6 ou 12 dias. A superfície total de *C. albicans* aderida foi corada com cristal violeta e examinada em microscópio óptico com ampliação de 400x. Como resultado foi observado que após 2 dias a resina modificada com ácido metacrílico apresentou menor nível de adesão de *Candida* que os outros grupos. Entretanto, os grupos com resina modificada e com superfície tratada um polímero auto-aderente não apresentaram diferença após 4, 6 e 12 dias de incubação. Modificações nas características de superfície de polímeros é um método eficaz na redução da adesão de *C. albicans* a superfícies de PMMA.

Amin et al.⁵ (2009) incorporaram drogas antifúngicas (fluconazol, clorexidina e a combinação dessas duas) em uma resina acrílica autopolimerizável e avaliaram a liberação dessas drogas bem como seu efeito no crescimento de *C. albicans*. Por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), avaliou-se a liberação estas substâncias em água após imersão de espécimes de resina acrílica contendo 10% de fluconazol ou 10% de clorexidina ou uma combinação de 5% de fluconazol com 5% de clorexidina. Alíquotas dessas substâncias liberadas em

água foram inoculadas em orifícios de placas de Petri cultivadas com *C. albicans*, para avaliação da inibição do crescimento fúngico por meio de mensuração do halo de inibição. Os resultados mostraram que as duas drogas isoladas ou a combinação delas podem ser incorporadas com o PMMA. Foi evidenciada liberação das drogas para água destilada ao longo de 28 dias. A inibição do crescimento foi encontrada em todos os grupos, com valores mais expressivos para o grupo onde as duas drogas foram combinadas. Conclui-se que os resultados deste estudo tem uma relevância clínica uma vez que pode contribuir significativamente no tratamento de infecções fúngicas da cavidade oral.

Redding et al.⁷¹ (2009) investigaram a capacidade de um polímero de fina película contendo antifúngicos de inibir a formação de biofilme de *Candida* sobre a superfície de resina acrílica. Ao polímero foram incorporados um dos seguintes antifúngicos: diacetato de clorexidina a 1 %, nistatina a 1% e anfotericina B a 0,1%. Após aplicação do polímero nos espécimes em resina acrílica, os mesmos foram levados a uma máquina de escovação e submetidos a um ciclo que simulou limpeza diária da prótese por 1 minuto durante 1 ano. Os espécimes foram incubados em suspensão de *C. albicans* e a formação de biofilme foi avaliada pelo método colorimétrico com sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5- sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT). Uma pequena redução no biofilme foi encontrada no grupo contendo apenas o polímero sem antifúngicos em comparação com o grupo controle (sem aplicação do agente). Entretanto, uma redução significativa de 70 a 80% foi encontrada para o grupo contendo nistatina,

de 50 a 60% para o grupo contendo anfotericina B e até 98% para o grupo contendo clorexidina. A aplicação de um polímero contendo antifúngicos inibe efetivamente a formação de biofilme de *C. albicans* na superfície de resina acrílica e deve ser avaliada como uma possível terapia preventiva para estomatite protética.

Paleari et al.⁵⁹, em 2009, investigaram a presença de grupos amina e avaliaram o efeito da incorporação do metacrilato 2-tert-butilaminoetil (TBAEMA) metacrilato em uma resina acrílica para base protética. Foram confeccionados corpos-de-prova com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 1,75% e 2%) de TBAEMA incorporado em relação ao líquido da resina acrílica Lucitone 550. Os espécimes foram submetidos a avaliações em espalhamento superficial de elétrons com análise química (ESCA) e ao teste de resistência à flexão. Observou-se a presença de nitrogênio na superfície dos espécimes, indicativo da presença dos grupos amina. A incorporação de TBAEMA afetou negativamente a resistência à flexão da resina acrílica, entretanto os valores de resistência à flexão até a concentração de 1,75% estavam de acordo com a norma ISO.

A fim de desenvolver uma resina acrílica auto-polimerizável (UNIFAST III) com propriedade antibacteriana, Kuroki et al.⁴⁰ (2010) avaliaram a atividade antibacteriana, liberação de monômero residual e alteração de cor desta resina após a adição de três agentes antibacterianos inorgânicos comercialmente

disponível que continham zeólitos de prata e zinco (Zeomic, Bactekiller e Novaron). Para análise da atividade antimicrobiana foram avaliados a adesão de *Streptococcus mutans* aos espécimes contendo os agentes antibacterianos inorgânicos e o número de células viáveis de *Streptococcus mutans*. Para quantificação de monômero residual utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência e a alteração de cor causada pela adição de agentes antibacterianos foi avaliada por um sistema recomendado pela CIE. Como resultado, observou-se que uma redução significativa na contagem de células viáveis e na adesão de *Streptococcus mutans* nos espécimes contendo os agentes antibacterianos quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos contendo os agentes inorgânicos quanto ao conteúdo de monômero residual. Além disso, entre os agentes inorgânicos antibacterianos adicionados o Novaron, apresentou a menor alteração de cor. Conclui-se que a adição de agentes antibacterianos a resinas acrílicas é o primeiro passo efetivo para o desenvolvimento de resinas acrílicas auto-polimerizáveis contendo propriedade antibacteriana.

Zamperini et al.⁹³, em 2010, investigaram se modificações na superfície com tratamentos de plasma poderia reduzir a adesão de *C. albicans* na resina. Espécimes com superfícies rugosas e lisas foram confeccionados, divididos em cinco grupos: controle (sem tratamento) e grupos que receberam tratamentos de plasma para obter superfícies com diferentes hidrofobicidade: argônio a uma atmosfera de 50W (Ar/50W); argônio/oxigênio a uma atmosfera de 70W

(ArO₂/70W); ar atmosférico de 130 w (AA_t/130W) ou argônio seguido da incorporação de flúor (Ar/SF₆ 70W). Medidas de ângulo de contato foram realizadas imediatamente após os tratamentos e depois da imersão em água por 48h. Para cada grupo, metade das amostras foram incubadas com saliva antes do ensaio de adesão. O número de leveduras aderidas foi avaliada pelo método colorimétrico com sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5- sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT). Para os grupos experimentais, houve alteração significativa no ângulo de contacto, após 48h de imersão em água. Grupos ArO₂/70W e ArSF₆/70W apresentaram leituras de absorvância significativamente menor que os demais grupos, independente da presença ou ausência de saliva e da rugosidade de superfície. Os resultados demonstraram que os tratamentos de plasma ArO₂/70W e ArSF₆/70W mostraram-se promissores na redução da aderência de *C. albicans* em resinas para base protética.

Monteiro et al.⁵⁰ (2010), através de uma revisão da literatura, avaliaram as várias formas de incorporação de prata utilizadas (zeólito de prata, nanopartículas de prata e incorporação de íons prata) como agente antimicrobiano frente a vários microrganismos e biofilme. De acordo com autores, as características de liberação dos íons de prata dependem da natureza da prata e da matriz polimérica utilizadas. E que tanto a prata elementar, zeólitos de prata e nanopartículas de prata podem ser utilizados como biomateriais antimicrobianos para uma variedade de aplicações.

Recentemente, Fan et al.²⁹ (2011), avaliaram se nanopartículas de prata (AgNPs) poderiam ser sintetizadas em resinas acrílicas. Uma resina acrílica fotopolimerizável e uma autopolimerizável foram utilizadas para sintetizar as AgNPs usando diferentes concentrações de benzoato de Ag (AgBz). Para a resina fotopolimerizável, através da dureza de Rockwell observou-se que a resina pode ser polimerizada com até 0,15% de AgBz, enquanto a dureza da resina autopolimerizável não foi afetada nas concentrações testadas. Através de espectroscopia na região do ultravioleta-visível e microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a presença de AgNPs em ambas as resinas. Na resina autopolimerizável observou-se a liberação de íons Ag^+ em todas as concentrações avaliadas, entretanto na resina fotopolimerizável a liberação foi detectável apenas com 0,1% de AgBz. A resina autopolimerizável contendo 0,2 e 0,5% de AgBz inibiram, 52,4% e 97,5% do crescimento de *Streptococcus mutans*, respectivamente. Futuros estudos são necessários para avaliar as propriedades mecânicas e otimizar a produção de resinas odontológicas e médicas comercialmente úteis.

Rodriguez⁷³ (2011), investigou a interação química entre o TBAEMA e a resina acrílica bem como a presença de grupos amina na superfície da resina, e ainda avaliou a temperatura de transição vítrea e a resistência à flexão da resina após a incorporação de TBAEMA. Os espécimes foram divididos em cinco grupos de acordo com as concentrações de TBAEMA incorporadas à resina Onda-Cryl: 0%, 1%, 2%, 3% e 4%. A superfície dos espécimes foi avaliada por meio de

Espalhamento Superficial de Elétrons com Análise Química (XPS-ESCA) para detectar a presença de grupos amina, representado por índices de nitrogênio. As análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foram utilizadas para avaliar o processo de polimerização da resina acrílica na presença do TBAEMA e a influência da incorporação do TBAEMA na temperatura de transição vítrea (Tg) da resina, respectivamente. A resistência à flexão dos espécimes também foi avaliada. Foram observados diferentes índices de nitrogênio: 0,36%, 0,54%, 0,35% e 0,20% para os grupos 1%, 2%, 3% e 4%, respectivamente. Os resultados obtidos para o FTIR indicaram copolimerização entre a resina e o TBAEMA, e para o DSC que a incorporação do TBAEMA reduziu a Tg. Foram encontradas diferenças significantes para a resistência à flexão ($p < 0.05$) cujos resultados foram $91,1 \pm 5,5A$, $77 \pm 13,1B$, $67,2 \pm 12,5B$, $64,4 \pm 13,0B$ e $67,2 \pm 5,9B$ MPa para os grupos 0%, 1%, 2%, 3% e 4%, respectivamente. Conclusão: A incorporação de TBAEMA resultou em copolimerização, na presença de grupos amina na superfície dos espécimes, na diminuição da Tg e da resistência à flexão.

Proposição

Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica termopolimerizável para base protética combinada ao polímero antimicrobiano poli(2 tert-butilaminoetil) metacrilato sobre a formação, *in vitro*, de biofilmes de três espécies de microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*).

Material e Método

1 Material

Para a realização deste estudo foram utilizados os materiais e aparelhos descritos abaixo.

- Silicona de condensação Zetalabor, Zermack, S.P.A., Badia Polesine, Rovigo, Itália.
- Adesivo instantâneo Loctite, Diadema, SP, Brasil.
- Mufla metálica, OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
- Espátula de aço nº 36 Duflex SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Espátula para gesso Jon Jon , São Paulo, SP, Brasil.
- Buril de Le cron, Duflex SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Gesso pedra tipo III, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Gesso pedra tipo IV, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ , Brasil.
- Isolante para resina acrílica Cel-Lac, Artigos Odontológicos Clássico Ltda, São Paulo, SP, Brasil.
- Lâminas de vidro
- Resina acrílica Lucitone 550, Dentsply International Inc., York, PA, EUA.
- Metacrilato 2 tert-butilaminoetil (TBAEMA)

- Balança de precisão eletrônica Bel Engineering Monza, Itália.
- Prensa hidráulica, Vipi-delta Máquinas especiais, Pirassununga, SP, Brasil.
- Termopolimerizadora automática, Solab Equipamentos para laboratórios Ltda, Piracicaba, SP, Brasil.
- Fresa tipo Maxicut, Malleifer SA, Ballaigues, Suíça.
- Embalagens para esterilização em óxido de etileno, produzidas por ACECIL Comércio e Esterilização a Óxido de Etileno Ltda, Campinas, SP, Brasil.
- Cultura de *Candida albicans* ATCC 90028
- Cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Cultura de *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Tryptic Soy Broth (TSB), Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA.
- Brain-heart infusion (BHI), Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA.
- Sabouraud Dextrose Agar com cloranfenicol, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA.
- Mannitol Salt Agar, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA.
- Agitador de tubos, AP-56 Phoenix, Araraquara, SP, Brasil.

- Espectrofotômetro, Eppendorf AG, Alemanha.
- Placa para cultura celular de 12 orifícios, Costar, Corning Incorporated, NY, EUA.
- Incubadora, 430 RDB Nova Ética , Vargem Grande Paulista, SP, Brasil.
- Tubos de para centrífuga em polietileno estéril, Corning Incorporated, NY, EUA.
- Ultra-som, 1440 Plus, Odontobras, São Paulo, SP, Brasil.
- Placa de Petri descartável estéril 90x15mm, Prolab, São Paulo, SP, Brasil.
- Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil.
- Contador de colônias digital, CP 600 Plus, Phoenix Ind. E Com. De Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil.

2 Método

2.1 Síntese do polímero poli(2 tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA)

A síntese do poli(2 tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) (Figura 1) foi realizada sob a orientação do Prof. Dr. Adhemar Ruvolo-Filho do Grupo de Pesquisa de Processamento e Propriedades em Polímeros do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos de acordo com uma rota química descrita por Sosna et al.⁸⁰.



FIGURA 1- Polímero poli(2-tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA).

2.2 Confeção de espécimes

Cada espécime correspondia a um disco de resina acrílica, réplica de um disco de silicona apresentando 15 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, como será descrito abaixo.

Inclusão dos discos de silicona

Discos de silicona de condensação densa foram obtidos através da condensação manual desse material no interior de uma matriz metálica (Figura 2) apresentando no seu interior 10 orifícios com 15 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Após a polimerização, os discos de silicona foram fixados com adesivo instantâneo sobre uma lâmina de vidro (Figura 3). O conjunto discos de silicona/lâmina de vidro foi incluído em mufla metálica utilizando-se gesso pedra tipo III (Figura 4). Após presa do gesso, os espaços existentes entre os discos de silicona previamente fixados na lâmina de vidro foram preenchidos com gesso pedra tipo IV (Figura 5). Em seguida, após a presa do gesso tipo IV, uma nova

lâmina de vidro foi posicionada sobre o conjunto discos de sílica/gesso tipo IV, a contra-mufla foi posicionada e a inclusão finalizada com gesso pedra tipo III (Figura 6).

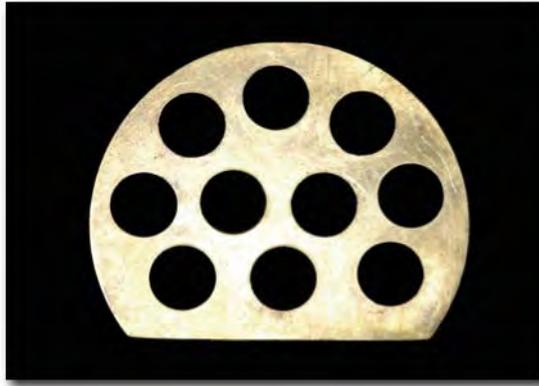


FIGURA 2- Matriz metálica.



FIGURA 3- Discos de sílica fixados sobre uma lâmina de vidro.



FIGURA 4- Inclusão do conjunto discos de silicona/lâmina de vidro em mufla metálica com gesso pedra tipo III.



FIGURA 5- Preenchimento dos espaços existentes entre os discos de silicona com gesso pedra tipo IV.



FIGURA 6- Inclusão de uma nova lâmina de vidro na contra-mufla.

Prensagem

Após a abertura da mufla, remoção dos discos de silicona (Figura 7), os resíduos do adesivo instantâneo foram removidos e realizado o isolamento do gesso com Cel-Lac. Em seguida, a prensagem da resina acrílica incorporada às diferentes concentrações do polímero poli(2 tert-butilaminoetil) (PTBAEMA) metacrilato foi realizada.



FIGURA 7- Remoção dos discos de silicona, após abertura da mufla.

Os espécimes foram divididos em três grupos, de acordo com as diferentes concentrações de PTBAEMA: 0 (controle), 10 e 25%. A incorporação do PTBAEMA foi realizada respeitando a proporção recomendada pelo fabricante da resina Lucitone 550, 21g de pó para 10ml do monômero. A quantidade de PTBAEMA adicionada foi calculada em proporção à massa de pó da resina acrílica. Dessa forma, no grupo contendo 10% de PTBAEMA adicionou-se 2,1g deste polímero e 21g de pó da resina acrílica. Então, primeiramente acrescentou-se o PTBAEMA ao pó da resina acrílica, após homogeneização, a quantidade de monômero suficiente para a massa final de pó e PTBAEMA (Tabela 1) foi em

seguida acrescida lentamente à mistura. A concentração de 25% de PTBAEMA foi obtida seguindo o mesmo raciocínio. Após atingir a fase plástica, a resina acrílica foi acomodada no interior dos orifícios deixados pelos discos de silicona.

Tabela 1- Descrição das proporções de pó/líquido da resina acrílica e PTBAEMA utilizadas em de cada grupo avaliado neste estudo

Grupo	Pó (g)	PTBAEMA (g)	Líquido (ml)
Controle	21	0	10
10%	21	2,1	11
25%	21	5,25	12,50

Para uma correta acomodação da resina acrílica e uma agregação adequada do monômero ao polímero da resina acrílica, um período de 30 minutos foi aguardado sob a prensa (Figura 8)⁶. Posteriormente, as muflas foram fechadas com auxílio de parafusos próprios e, então, levadas para polimerização no ciclo estabelecido pelo fabricante (1 hora à 73°C e 30 minutos à 100°C) em uma termopolimerizadora automática Solab.



FIGURA 8- Prensagem da resina acrílica por um período de 30 minutos.

Desinclusão e acabamento

Após a polimerização, as muflas foram resfriadas sobre bancada por 24 horas e, então, os espécimes foram desincluídos. Após a desinclusão, os excessos laterais verificados nos espécimes foram removidos com uma ponta do tipo Maxicut (Figura 9). Após o acabamento, cada espécime foi armazenado em água destilada por 1 dia à 37°C⁴⁷.



FIGURA 9- Remoção dos excessos laterais com ponta Maxicut.

Esterilização dos espécimes

Após este período de armazenamento em água destilada, os espécimes foram esterilizados por meio de óxido de etileno (Figura 10) e armazenados em embalagem própria.



FIGURA 10- Espécime esterilizado por meio de óxido de etileno e armazenado em embalagem própria.

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana sobre a formação de biofilmes

Os procedimentos descritos abaixo foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP sob a supervisão da Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio.

Preparo dos materiais microbiológicos

Para a inoculação dos microrganismos avaliados foram utilizados os meios de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) para *Candida albicans* e Brain-heart

infusion (BHI) para as bactérias *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Esses meios de cultura constituem-se de um caldo nutriente que propicia o crescimento de vários tipos de microrganismos, incluindo os que foram testados neste estudo.

Formação do biofilme

Inicialmente, os microrganismos selecionados foram individualmente inoculados em tubos de ensaios contendo 5 mL do meio de cultura apropriado. Em seguida, estes tubos foram incubados a 37°C por 24 horas.

Para observar o crescimento dos microrganismos, os tubos de ensaio foram colocados em agitador de tubos e agitados vigorosamente por 30 segundos. Então, os tubos de ensaio foram retirados do agitador e turvação da suspensão foi monitorada por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro até atingir D.O.=1,0 para *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* e D.O.=0,15 para *Streptococcus mutans* em absorvância de 600 nm, o que corresponde a uma suspensão microbiana de aproximadamente 10^7 UFC/mL (Figura 11).



FIGURA 11- Monitoramento da turvação da suspensão por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro.

Previamente a inoculação, os espécimes de cada grupo foram aleatoriamente distribuídos, individualmente, em orifícios de uma placa para cultura celular de 12 orifícios e acrescentado 2 mL de meio de cultura (TSB ou BHI) contendo uma alíquota correspondente a 10^7 UFC/mL de cada microrganismo testados previamente inoculados (Figura 12). Após a inoculação, as placas contendo os espécimes foram incubadas a 37°C por 1 hora e 30 minutos em incubadora sob agitação de 75 rpm (Figura 13), com a finalidade de promover a adesão dos microrganismos na superfície dos espécimes⁸³.



FIGURA 12- Inoculação dos espécimes.



FIGURA 13- Incubadora utilizada no estudo (Incubadora 430 RDB Nova Ética).

Após este período, cada espécime foi lavado com tampão Fosfato 0,1 M - pH 7,1 (PBS), de maneira cuidadosa e por dois períodos, a fim de remover os microrganismos fracamente aderidos na superfície dos espécimes (Figura 14).

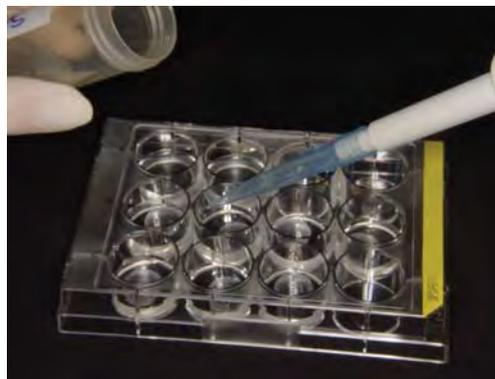


FIGURA 14- Espécimes lavados com PBS.

Em seguida, os espécimes foram removidos e transferidos individualmente para orifícios de uma nova placa para cultura celular de 12 orifícios contendo 2 mL de meio de cultura estéril (TSB ou BHI) e incubados a

37°C por 48 horas em incubadora sob agitação de 75 rpm, a fim de promover a maturação do biofilme⁸³.

Após este período, cada espécime foi novamente lavado com PBS, como descrito anteriormente, a fim de remover os microrganismos fracamente aderidos na superfície dos espécimes. Em seguida, os espécimes foram removidos e transferidos individualmente para tubos com tampa de rosca contendo 4,5 mL de solução salina estéril (Figura 15).



FIGURA 15- Transferência de cada espécime para tubo com tampa de rosca contendo 4,5 mL de solução salina estéril.

Então, esses tubos com tampa de rosca contendo os espécimes foram agitados por 20 minutos em ultra-som para desprender qualquer célula microbiana aderente do espécime para a solução resultante.

Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas a partir dessa solução resultante. Para isso, uma alíquota de 500 μL da solução resultante foi

pipetada e transferida para outro tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina estéril. Este último tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos e uma nova alíquota de 500 μ L foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 4,5 μ L de solução salina. Esse procedimento foi realizado cinco vezes para cada espécime e, dessa forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} foram obtidas.

As últimas quatro diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) foram utilizadas para a realização da semeadura nas placas de Petri contendo os meios de culturas selecionados para cada microrganismo: Mannitol Salt Agar para *Staphylococcus aureus* e Sabouraud Dextrose Agar contendo 5 μ g/mL de cloranfenicol para *Candida albicans* e SB20 para *Streptococcus mutans*. Para este procedimento, os tubos de ensaio contendo as diluições seriadas selecionadas foram individualmente agitados em agitador de tubos de ensaio. Em seguida, uma alíquota de 25 μ L de cada diluição seriada selecionada, a partir da diluição de 10^{-5} até 10^{-2} foi pipetada. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes de uma placa de Petri contendo o meio de cultura específico para cada microrganismo. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. Em seguida, as placas referentes aos grupos experimentais foram igualmente submetidas à incubação a 37°C por 48 horas. Os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicata.

Contagem de colônias

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri foram submetidos à contagem de colônias. Para este procedimento, cada placa de Petri foi posicionada em um contador de colônias digital. Foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido, para cada microrganismo, o número de colônias referente a uma única diluição que representasse um valor entre a variação considerada. Após a obtenção desse valor nos meios de cultura, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) foi calculado. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\text{UFC/ml} = \text{número de colônias} \times 10^n / q$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (2, 3, 4 ou 5), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas. No presente estudo, q= 0,025 já que foram pipetados 25 µL para cada diluição. Os valores de UFC/ml obtidos foram deixados em notação científica e obtida então a média aritmética dos valores das duplicatas de cada amostra (apresentados nos Anexos - Tabelas A1 a A3). Em seguida, os dados obtidos para as contagens foram transformados de acordo com a fórmula $\log(\text{UFC}+1)/\text{ml}$.

2.4 Análise dos dados

A hipótese nula deste estudo compreendia que nenhum dos três grupos avaliados (controle, 10 e 25% de PTBAEMA) alteraria a atividade antimicrobiana sobre a formação de biofilmes das três espécies testadas. A maioria dos valores grupais, exceto o grupo contendo 25% PTBAEMA para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, aderiu à distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$). No entanto, não se observou homogeneidade de variância para nenhuma espécie (teste de Levene, $P < 0,05$). Dessa forma, os dados de $\log(\text{UFC}+1)/\text{ml}$ de cada grupo foram apresentados pelos valores médios e desvios padrão. E usou-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney para comparação entre o grupo controle e o grupo contendo 10% de PTBAEMA para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* e teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os três grupos avaliados (0, 10 e 25%) para *Candida albicans*. Todos os testes estatísticos foram empregados obedecendo-se a um nível de significância (α) de 0,05.

Resultado

Resultado

As sementeiras das placas de Petri referentes aos grupos contendo as concentrações de 0, 10 e 25% de PTBAEMA de cada microrganismo *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* estão representados nas Figuras 16, 17 e 18 respectivamente. As Figuras 16 e 17 evidenciam a ausência de formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans* sobre os espécimes contendo 25% de PTBAEMA e também uma redução considerável na formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans* nos grupos contendo 10% de PTBAEMA.

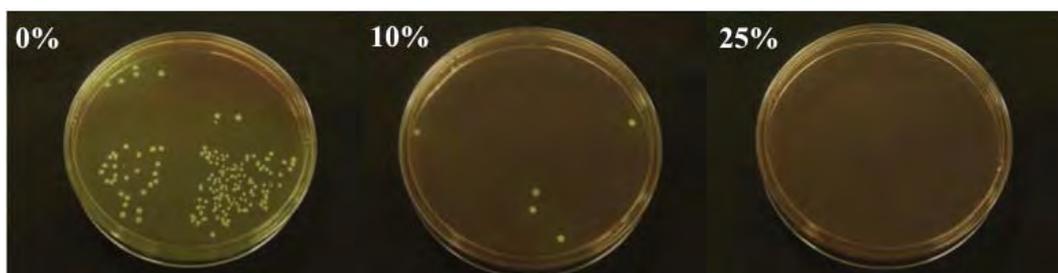


FIGURA 16 - Placas de Petri representativas das sementeiras de *S. aureus* referentes aos grupos 0%, 10 % e 25%.



FIGURA 17 - Placas de Petri representativas das sementeiras de *S. mutans* referentes aos grupos 0%, 10 % e 25%.

Na Figura 18, uma aparente redução no número de células viáveis de biofilme de *C. albicans* pode ser observada no grupo contendo 25% de PTBAEMA quando comparado ao grupo controle.



FIGURA 18 - Placas de Petri representativas das sementeiras de *C. albicans* referentes aos grupos 0%, 10 % e 25%.

As médias e respectivos desvios-padrão de UFC/ml, após transformação logarítmica (\log_{10}), de cada grupo com as diferentes concentrações de PTBAEMA e diferentes microrganismos estão listados na tabela 2.

Tabela 2- Resultados médios (desvios-padrão) do número de UFC/ml para cada microrganismo após transformação logarítmica (\log_{10}).

Grupo	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
0%	7,9 (0,8)	7,5 (0,7)	6,6 (0,2)
10%	3,8 (3,3)	5,1 (2,7)	6,6 (0,4)
25%	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	6,4 (0,1)

Devido a ausência de homogeneidade de variância, os valores de $\log(\text{UFC} + 1)/\text{ml}$ para *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* foram analisados por testes não paramétricos e estão representados nos Gráficos 1, 2 e 3, respectivamente.

No Gráfico 1 pode-se observar que o grupo contendo 25% de PTBAEMA inibiu totalmente a formação de biofilme de *S. aureus* sobre os espécimes, reduzindo a zero o número de células viáveis do biofilme desta espécie. A concentração de 10% de PTBAEMA na resina acrílica avaliada reduziu de forma significativa a formação de biofilme de *S. aureus* quando comparado ao grupo controle ($P=0,001$).

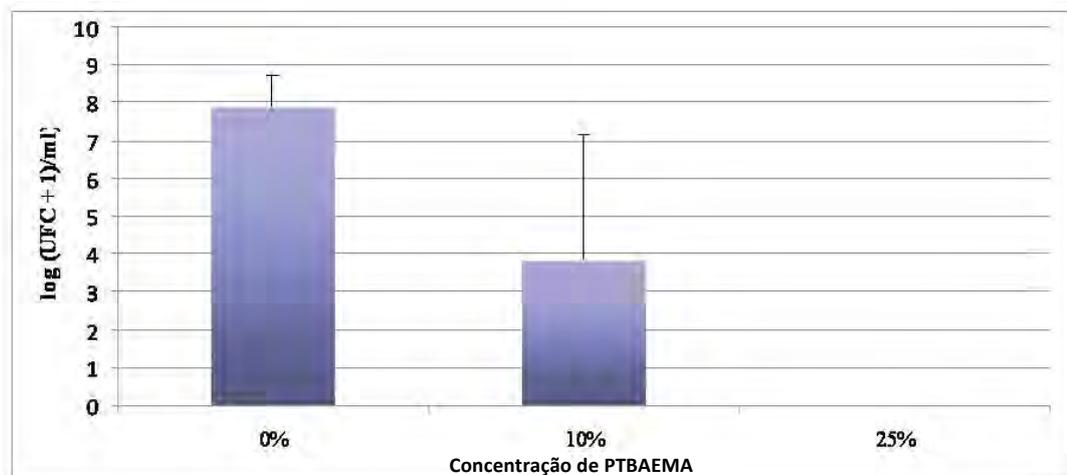


GRÁFICO 1 - Contagens médias de células viáveis de biofilme de *S. aureus* formado sobre os espécimes contendo diferentes concentrações de PTBAEMA. As barras de erro representam os desvios-padrão. (Teste de Mann-Whitney, $P=0,001$)

Resultados semelhantes podem ser observados no Gráfico 2, em que não houve a formação de biofilme de *S. mutans* sobre os espécimes contendo 25% de PTBAEMA. E uma redução significativa de células viáveis de biofilme de *S. mutans* pode ser observada no grupo com 10% de PTBAEMA em relação aos valores encontrados no grupo controle (P=0,001).

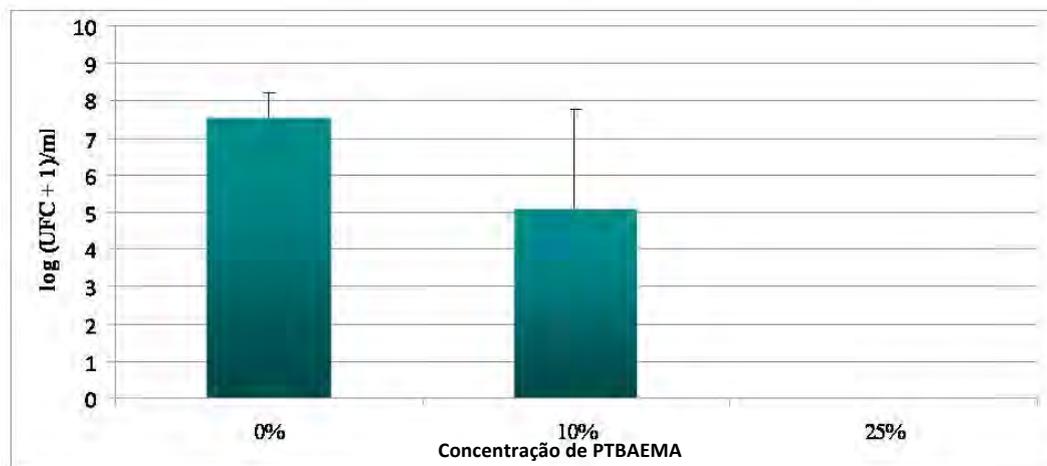


GRÁFICO 2 - Contagens médias de células viáveis de biofilme de *S. mutans* formado sobre os espécimes contendo diferentes concentrações de PTBAEMA. As barras de erro representam os desvios-padrão. (Teste de Mann-Whitney, P=0,001)

No Gráfico 3, observa-se que os espécimes de resina acrílica combinada ao PTBAEMA não apresentou efetividade no controle de biofilme de *C. albicans*. Visto que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos contendo PTBAEMA e o grupo controle em relação ao número de células viáveis (P=0,079).

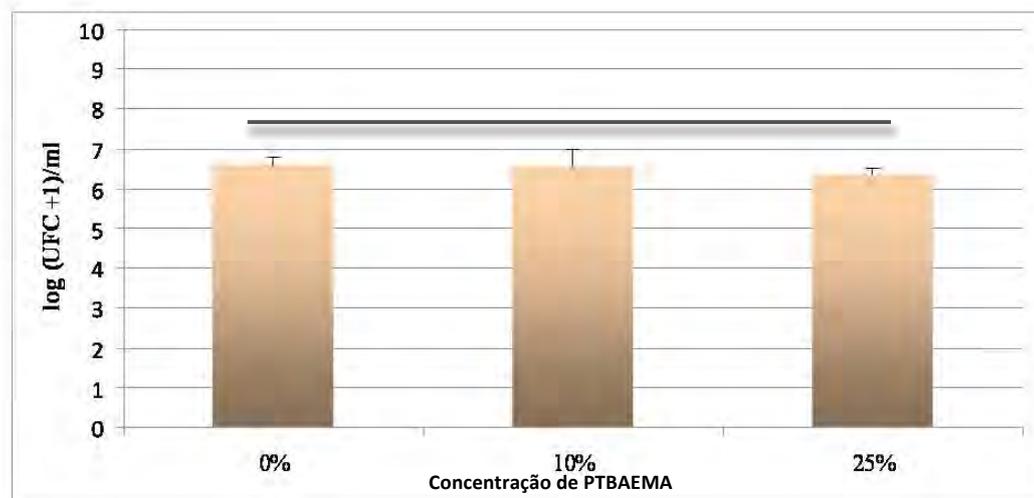


GRÁFICO 3 - Contagens médias de células viáveis de biofilme de *C. albicans* formado sobre os espécimes contendo diferentes concentrações de PTBAEMA. As barras de erro representam os desvios-padrão. Médias localizadas sob a barra horizontal são semelhantes. (Teste de Kruskal-Wallis, P=0,079)

Discussão

Discussão

Atualmente, está cada vez mais crescente a procura e o desenvolvimento de materiais com propriedades antimicrobianas⁷⁷. Áreas com grande potencial de aplicação incluem, por exemplo, tratamento de água, armazenamento de produtos alimentares, dispositivos médicos e materiais odontológicos^{40,77}.

Na odontologia, nos últimos anos, inúmeros estudos foram realizados no intuito de controlar a formação de biofilme sobre as superfícies de próteses removíveis e conseqüentemente prevenir a estomatite protética, através da incorporação de agentes antimicrobianos em reembasadores temporários e condicionadores de tecido, bem como em resinas acrílicas. No entanto, a adição de agentes como nistatina, miconazol, fluconazol, itraconazol, própolis, clorexidina, triclosan, zeólito de prata e zinco, nanopartículas de prata metálica e dióxido de titânio^{5,19,20,28,29,40,41,43,48,50,55,71,78,86} uma vez que são gradualmente liberados, apresentam como desvantagens a perda das propriedades antimicrobianas com o tempo, toxicidade à mucosa do paciente e prejuízos às propriedades mecânicas do material^{37,59,64,77,79}.

Pesquisas recentes têm buscado então, alternativas que reduzem a suscetibilidade dos materiais odontológicos à adesão microbiana, como o tratamento superficial com plasma⁹¹⁻⁹³. Outra vertente, têm sido a adição de agentes antimicrobianos, como compostos de amônio quaternário^{37,64,65}, que não dependem da sua liberação e que ao serem incorporados aos materiais

odontológicos se ligam quimicamente a estes, passando a integrar-se a matriz do material.

De uma maneira semelhante, este estudo incorporou a uma resina acrílica um polímero policatiônico, o poli(2-tert-butilaminoetil) metacrilato, que apresenta grupos amina livres em uma das extremidades de sua molécula e exhibe uma alta atividade antimicrobiana⁷⁷. Este polímero, até o momento, ainda não incorporado a um material odontológico, exerce sua atividade antimicrobiana por meio do contato direto com o microrganismo e ainda apresenta uma baixa solubilidade em água^{45,73,77}.

Neste estudo, após a síntese do polímero poli(2-tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) e sua incorporação na resina acrílica Lucitone 550 nas concentrações de 0, 10 e 25%, avaliou-se a capacidade desta resina de inibir a formação de biofilmes de *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*.

Os resultados encontrados demonstraram que a resina acrílica contendo 10% e 25% de PTBAEMA exerceu um efeito considerável na inibição de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*. O grupo contendo 10% de PTBAEMA reduziu significativamente a quantidade de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans* formados sobre os espécimes quando comparado ao grupo controle. Já na concentração de 25%, a contagem de células viáveis de *S. aureus* e *S. mutans* foi igual a zero, concluindo-se que houve uma completa inibição na formação de biofilme destes microrganismos sobre os espécimes contendo esta concentração. Estes fatos evidenciam uma relação dose-resposta do PTBAEMA, semelhante a outros agentes antimicrobianos incorporados em resinas acrílicas^{20,28,64,65}.

Apesar de diferentes materiais e concentrações do polímero PTBAEMA utilizadas, resultados semelhantes foram observados em outros estudos^{35,45,77,84}. Em 2006, Seyfriedsberger, Rametsteiner e Kern⁷⁷ investigaram as propriedades antimicrobianas de um polietileno contendo diferentes concentrações do polímero poli (2-tert-butilaminoetil) metacrilato e também observaram que o número de UFC/ml de *S. aureus* reduziu a zero após 24 horas de contato com grupos contendo PTBAEMA. Também em 2006, achados de Ignatova et al.³⁵, mostraram que um aço inoxidável revestido por PTBAEMA reduziu a adesão de *S. aureus* em 99,9%. Achados semelhantes também foram encontrados por Lenoir et al.⁴⁵ (2006) e Thomassin et al.⁸⁴ (2007) após avaliação das propriedades antimicrobianas de compostos incorporados com polímero poli(2-tert-butilaminoetil) metacrilato frente a bactéria *E. coli*, em que o número de bactérias foi totalmente eliminado após determinado período de tempo.

O mecanismo de ação do polímero poli (2-tert-butilaminoetil) metacrilato é explicado pela presença de grupos amina livres em uma das extremidades da cadeia polimérica que tem o potencial de substituir os cátions divalentes, Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} , presentes na parede celular de bactérias, provocando assim o deslocamento desses íons, conseqüentemente acarretando no aumento da permeabilidade celular, desorganização da membrana, lise das células e na morte das bactérias^{45,77}.

As espécies bacterianas testadas, *S. aureus* e *S. mutans* são classificadas em bactérias gram-positivas e portanto apresentam características

semelhantes, o que justifica terem apresentado comportamentos parecidos frente as condições experimentais avaliadas neste estudo.

Um fator limitante deste estudo é a avaliação da capacidade de inibir a formação de biofilme de uma única espécie, ao invés de investigar a atividade antimicrobiana do PTBAEMA sobre a formação de biofilme contendo espécies fúngicas e espécies bacterianas aeróbias e anaeróbias, o que representaria as condições mais próximas àquelas encontradas na cavidade bucal. De acordo com Park et al.⁶⁰, a interação entre diferentes espécies poderia influenciar a formação de biofilme sobre a resina acrílica. Thein, Samaranayake e Samaranayake⁸³ encontraram interação de forma complexa entre diferentes espécies bacterianas e *C. albicans* na modulação da matriz do biofilme bacteriano/fúngico. Apesar de ter sido avaliado isoladamente, estas interações entre diferentes espécies ressaltam a importância dos resultados encontrados neste estudo frente ao microrganismo *S. mutans*, uma vez que é considerado um dos colonizadores primários do biofilme oral e portanto estão fortemente envolvidos com as fases iniciais de formação de biofilme, produzindo matriz extra-celular de polissacarídeo e facilitando a adesão de outros microrganismos, como por exemplo de *C. albicans*^{40,83}.

Em relação a *C. albicans*, os grupos contendo as diferentes concentrações de PTBAEMA, 10 e 25%, não exerceram atividade antimicrobiana sobre a formação de biofilme desta espécie. Esses achados divergem dos resultados encontrados por Park, Periathamby e Loza⁶², em 2003, e Park et al.⁶⁰ em 2008. Esses autores incorporaram ácido metacrílico a uma resina acrílica para base protética e observaram uma redução no número de *C. albicans* aderidas. Essa

divergência de resultados pode estar relacionada com a capacidade de interação de cada agente com a parede celular fúngica^{62,82}. A parede celular dos fungos é constituída basicamente por quitina, β -glucanos e manoproteínas, sendo estes presentes na camada externa, conferindo características aniônicas a parede celular dos fungos⁶². Dessa forma, os autores concluíram que o ácido metacrílico propicia um ambiente de repulsão eletrostática pela interação da carga negativa da superfície do material modificado com a carga negativa da parede celular da *C. albicans*⁶². Baseando-se neste raciocínio, a superfície da resina acrílica contendo PTBAEMA apresentaria carga positiva devido natureza policatiônica deste polímero, resultando em uma superfície com atração eletrostática pela carga negativa da parede celular da *C. albicans*. Este fato então, justificaria a formação de biofilme de *C. albicans* na superfície dos espécimes contendo PTBAEMA. Entretanto, além da interação de forças eletrostáticas entre a superfície e o microrganismo, outros fatores como rugosidade superficial, polaridade, presença de saliva e hidrofiliabilidade do substrato influenciam na formação de biofilme de *Candida*^{47,93}, o que aponta a necessidade de futuras investigações para maiores esclarecimentos dos resultados obtidos neste estudo.

Apesar de não inibir a formação de biofilme de *C. albicans*, os resultados da incorporação do PTBAEMA à resina acrílica testada podem ser considerados promissores, uma vez que apresentou propriedade bactericida. O que justificaria sua aplicabilidade na clínica odontológica, como o desenvolvimento de resinas acrílicas autopolimerizáveis com propriedade antibacteriana. Estas resinas são rotineiramente utilizadas na confecção de coroas

provisórias e ao apresentarem propriedades antibacterianas possivelmente evitariam o acúmulo de placa bacteriana, reduzindo problemas periodontais comumente observados após a instalação destas coroas⁴⁰. Além disso, a incorporação de PTBAEMA em dispositivos médicos poderia ser uma ferramenta poderosa no controle de infecções hospitalares, em que *Staphylococcus aureus* são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade³⁵.

Entretanto, mais investigações teóricas e experimentais sobre os polímero PTBAEMA serão necessárias para elucidação de suas propriedades e comprovação de sua aplicabilidade clínica. Assim, outros estudos deverão ser conduzidos para determinar a citotoxicidade deste polímero e avaliar possíveis alterações nas propriedades da resina acrílica em decorrência da incorporação de PTBAEMA, tais como a resistência flexural, rugosidade superficial, dureza Vickers e estabilidade de cor da resina acrílica.

Conclusão

Conclusão

De acordo com a metodologia empregada e dentro das limitações deste estudo, conclui-se que:

1) A resina acrílica Lucitone 550 contendo 10% de PTBAEMA apresentou efeito bacteriostático na formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*;

2) A presença de PTBAEMA a 25% desempenhou uma atividade bactericida frente aos biofilmes de *S. aureus* e *S. mutans*;

3) As concentrações de 10 e 25% de PTBAEMA não tiveram efeito significativo na formação de biofilme de *C. albicans*.

Referências

Referências*

1. Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers. J Prosthet Dent. 1981; 45: 376-9.
2. Abu-Elteen KH, Abu-Alteen RM. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. New Microbiol. 1998; 21: 41-8.
3. Addy M. In vitro studies into the use of denture base and soft liner materials as carriers for drugs in the mouth. J Oral Rehabil. 1981; 8: 131-42.
4. Akiba N, Hayakawa I, Keh ES, Watanabe A. Antifungal effects of a tissue conditioner coating agent with TiO₂ photocatalyst. J Med Dent Sci. 2005; 52: 223-7.
5. Amin WM, Al-Ali MH, Salim NA, Al-Tarawneh SK. A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis. Eur J Dent. 2009; 3: 257-66.
6. Anusavice KJ. **Phillips' science of dental materials**. 10th ed. Pennsylvania: WB Saunders, 1996. p.237-271.
7. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. Br Dent J. 1979; 10: 267-72.

* De acordo com o estilo Vancouver.

8. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987; 14: 217-27.
9. Asad T, Watkinson AC, Hugget R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1992; 68: 191-5.
10. Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effects of various disinfectant solutions on the surface hardness of an acrylic resin denture base material. *Int J Prosthodont.* 1993; 6: 9-12.
11. Assery M, Sugrue PC, Graser GN, Eisenberg AD. Control of microbial contamination with commercially available cleaning solutions. *J Prosthet Dent.* 1992; 67:275-7.
12. Axell T, Samaranayake LP, Reichart PA, Olsen I. A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84: 111-2.
13. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc.* 1995; 61: 199-200.
14. Brace ML, Plummer KD. Practical denture disinfection. *J Prosthet Dent.* 1993; 70: 538-40.
15. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974; 82: 151-90.
16. Budtz-Jørgensen E, Carlino P. A miconazole lacquer in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Mycoses.* 1994; 37: 131-5.

17. Carlsson, G. E. Clinical morbidity and sequelae of treatment with complete dentures. *J Prosthet Dent.* 1998; 79: 17-23.
18. Carlsson J, Söderholm G, Almfeldt I. Prevalence of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* in the mouth of persons wearing full-dentures. *Arch Oral Biol.* 1969; 14: 243-9.
19. Casemiro LA, Gomes Martins CH, Pires-de-Souza Fde C, Panzeri H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. *Gerodontology.* 2008; 25: 187-94.
20. Chow CK, Matear DW, Lawrence HP. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. *Gerodontology.* 1999; 16: 110-8.
21. Compagnoni MA, Souza RF, Marra J, Pero AC, Barbosa DB. Relationship between *Candida* and the nocturnal denture wear: quantitative study. *J Oral Rehabil.* 2007; 34: 600-5.
22. Council on Dental Materials, Instruments, and Equipment. Denture cleansers. *J Am Dent Assoc.* 1983; 106: 77-9.
23. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008; 17: 627-33.
24. Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br Dent J.* 1970; 129: 151-6.

25. Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *J Prosthet Dent*. 1988; 60: 467-70.
26. Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. *Candida*-associated denture stomatitis. *Folia Microbiol*. 2001; 46: 443-46.
27. Douglas WH, Walker DM. Nystatin in denture liners - an alternative treatment of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1973; 135: 55-9.
28. El- Charkawi H, el-Said EA, Safouh HM, el-Raghi N. Effect of addition antimicrobial agents to denture reliners. *Egypt Dent J*. 1994; 40: 785-90.
29. Fan C, Chu L, Rawls HR, Norling BK, Cardenas HL, Whang K. Development of an antimicrobial resin-A pilot study. *Dent Mater*. 2011; 27: 322-8.
30. Fotos PG, Vincent SD, Hellstein JW. Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; 74: 41-9.
31. Frenkel H, Harvey I, Newcombe RG. Oral health care among nursing home residents in Avon. *Gerodontology*. 2000; 17: 33-8.
32. He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses*. 2006; 49: 80-4.
33. Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. *J Prosthet Dent*. 1990; 64: 48-52.

34. Hong S, et al. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug Chem.* 2006; 17: 728-34.
35. Ignatova M, et al. Combination of electrografting and atom-transfer radical polymerization for making the stainless steel surface antibacterial and protein antiadhesive. *Langmuir.* 2006; 22: 255-62.
36. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res.* 1994; 73: 1437-43.
37. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent Mater.* 2003; 19: 313-9.
38. Kina S, Conrado CA, Brenner AJ, Kurihara E. O ensino da estomatogeriatria no Brasil: A experiência de Maringá. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1996; 10: 69-73.
39. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72: 283-8.
40. Kuroki K, et al. Effect of self-cured acrylic resin added with an inorganic antibacterial agent on *Streptococcus mutans*. *Dent Mater J.* 2010; 29: 277-85.
41. Lamb DJ, Martin MV. An in vitro and in vivo study of the effect of incorporation of chlorhexidine into autopolymerizing acrylic resin plates upon the growth of *Candida albicans*. *Biomaterials.* 1983; 4: 205-9.

42. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242: 345–51.
43. Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent.* 2001; 85: 352-56.
44. Leles CR, Nakaoka MM, Souza RF, Compagnoni MA. Estudo retrospectivo dos fatores associados à longevidade de próteses totais. Parte I: Avaliação subjetiva e queixas dos pacientes. *PGR.* 1999; 2: 61-6.
45. Lenoir S, Pagnouille C, Galleni M, Compère P, Jérôme R, Detrembleur C. Polyolefin matrixes with permanent antibacterial activity: preparation, antibacterial activity, and action mode of the active species. *Biomacromolecules.* 2006; 7: 2291-6.
46. Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent.* 1999; 81: 202-6.
47. Manfredi M, Merigo E, Salati A, Conti S, Savi A, Polonelli L, et al. In vitro candidacidal activity of a synthetic killer decapeptide (KP) against *Candida albicans* cell adhered to resin acrylic discs. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36: 468-71.
48. Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. *J Dent.* 1997; 25: 373-7.

49. Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. Acta Microbiol Immunol Hung. 2007; 54: 201-35.
50. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34: 103-10.
51. Moreira RS, Nico LS, Tomita NE, Ruiz T. A saúde bucal do idoso brasileiro: revisão sistemática sobre o quadro epidemiológico e acesso aos serviços de saúde bucal. Cad. Saúde Pública. 2005, 21: 1665-75.
52. Muzyka BC. Oral fungal infections. Dent Clin North Am. 2005; 49: 49-65.
53. Nair RG, Samaranayake LP. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An in vitro study. APMIS. 1996; 104: 339-49.
54. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H. Commercial denture cleansers-cleansing efficacy against *Candida albicans* biofilm and compatibility wit soft denture-lining materials. Int J Prosthodont. 1995; 8: 434-44.
55. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H, Nakanoda S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. J Oral Rehabil. 1997; 24: 350-7.

-
56. Nikawa H, Nishimura H, Makihira S, Hamada T, Sadamori S, Samaranayake LP. Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses*. 2000; 43: 139-43.
 57. Ottersbach P, Kossmann B. Eine neue klasse von bioziden. *GIT Labor Fachzeitschrift*. 2002; 46: 452-6.
 58. Ottersbach P, Sosna F. Antimikrobielle Zusatzstoffe. Patent DE 10022453, 15 Mar. 2001. Disponível em: <http://www.patent-de.com/20010315/DE10022453A1.html>.
 59. Paleari AG, Marra J, Pero AC, Rodriguez LS, Ruvolo-Filho A, Compagnoni MA. Effect of incorporation of 2-tert-butylaminoethyl methacrylate on flexural strength of a denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci*. [online] 2011; 19: 195-9.
 60. Park SE, Blissett R, Susarla SM, Weber HP. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. *J Prosthodont*. 2008; 17: 365-9.
 61. Park SE, Chao M, Raj PA. Mechanical properties of surface-charged poly(methyl methacrylate) as denture resins. *Int J Dent*. 2009; Article ID 841431, 6 p.
 62. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *J Prosthodont*. 2003; 12: 249-54.
 63. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil*. 2003; 30: 532-6.

-
64. Pesci-Bardon C, Fosse T, Madinier I, Serre D. In vitro new dialysis protocol to assay the antiseptic properties of a quaternary ammonium compound polymerized with denture acrylic resin. *Lett Appl Microbiol.* 2004; 39: 226-31.
 65. Pesci-Bardon C, Fosse T, Serre D, Madinier I. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. *Gerodontology.* 2006; 23: 111-6.
 66. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil.* 2002; 29: 1115-9.
 67. Quinn DM. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 1985; 12: 177-82.
 68. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10: 99-116.
 69. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 53-9.
 70. Ramos LR, Veras RP, Kalache A. Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira. *Rev Saúde Pública.* 1987; 21: 211-24.

-
71. Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 669-72.
 72. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1-8.
 73. Rodriguez LS. Incorporação do metacrilato 2-tert-butilaminoetil à uma resina acrílica para base protética: caracterização química e efeito sobre resistência flexural [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.
 74. Rossi T, Peltonen R, Laine J, Eerola E, Vuopio-Varkila J, Kotilainen P. Eradication of the long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients wearing dentures: a follow-up of 10 patients. *J Hosp Infect.* 1996; 34: 311-20.
 75. Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology.* 2003; 49: 301-9.
 76. Sesma N, Laganá DC, Morimoto S, Gil C. Effect of denture surface glazing on denture plaque formation. *Braz Dent J.* 2005; 16: 129-34.
 77. Seyfriedsberger G, Rametsteiner K, Kern W. Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. *Euro Polym Jnl.* 2006; 42: 3383-89.
 78. Shibata T, Hamada N, Kimoto K, Sawada T, Sawada T, Kumada H, et al. Antifungal effect of acrylic resin containing apatite-coated TiO₂ photocatalyst. *Dent Mater J.* 2007; 26: 437-44.

79. Silva WJ, Rached RN, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Effects of nystatin, fluconazole and propolis on poly(methyl methacrylate) resin surface. *Braz Dent J.* 2008; 19: 190-6.
80. Sosna F, Ottersbach P, Kossmann B. Antimicrobial additives. Patent US 6790910 B1, 14 Set. 2004. Disponível em: <http://ip.com/patent/US6790910>. Acesso em: 20 abril. 2011.
81. Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. *Gerodontology.* 2003; 20: 84-7.
82. Taweekhaisupapong S, Klanrit P, Singhara S, Pitiphat W, Wongkham S. Inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. *J Ethnopharmacol.* 2006; 19: 414-7.
83. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 672-80.
84. Thomassin JM, Lenoir S, Riga J, Jérôme R, Detrembleur C. Grafting of poly[2-(tert-butylamino)ethyl methacrylate] onto polypropylene by reactive blending and antibacterial activity of the copolymer. *Biomacromolecules,* 2007; 8: 1171-77.
85. Torres SR, et al. Clinical aspects of *Candida* species carriage in saliva of xerostomic subjects. *Med Mycol.* 2003; 41: 411-5.

86. Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. *J Prosthet Dent.* 1994; 71: 517-24.
87. Urban VM, de Souza RF, Arrais CA, Borsato KT, Vaz LG. Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. *J Prosthodont.* 2006; 15: 295-9.
88. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998; 43: 45-50.
89. Wilson J. The etiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J.* 1998; 185: 380-4.
90. Wilson SJ, Wilson HJ. The release of chlorhexidine from modified dental acrylic resin. *J Oral Rehabil.* 1993; 20: 311-9.
91. Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil.* 2005; 32: 518-25.
92. Yildirim MS, Kesimer M, Hasirci N, Kiliç N, Hasanreisoglu U. Adsorption of human salivary mucin MG1 onto glow-discharge plasma treated acrylic resin surfaces. *J Oral Rehabil.* 2006; 33: 775-83.

93. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. Arch Oral Biol. 2010; 55: 763-70.

Apêndice

Apêndice

Tabela A1- Dados dos valores originais (UFC/mL) em notação científica das duplicatas referentes ao microrganismo *S. aureus* nos grupos avaliados (0, 10 e 25% de PTBAEMA)

Grupo 0%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	9,40E+06	1,01E+07	9,74E+06
Espécime 2	9,72E+06	6,96E+07	3,97E+07
Espécime 3	4,00E+04	8,00E+04	6,00E+04
Espécime 4	2,32E+07	2,40E+07	2,36E+07
Espécime 5	4,92E+06	4,32E+06	4,62E+06
Espécime 6	1,28E+06	2,24E+06	1,76E+06
Espécime 7	1,44E+07	2,12E+07	1,78E+07
Espécime 8	3,08E+07	2,80E+07	2,94E+07
Espécime 9	2,56E+07	2,04E+07	2,30E+07
Espécime 10	1,40E+07	1,20E+07	1,30E+07

Grupo 10%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	4,00E+05	2,80E+05	3,40E+05
Espécime 2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 3	4,00E+04	2,40E+05	1,40E+05
Espécime 4	8,00E+04	1,20E+05	1,00E+05
Espécime 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 6	4,00E+04	0,00E+00	2,00E+04
Espécime 7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 8	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 9	6,00E+05	9,60E+05	7,80E+05
Espécime 10	3,44E+06	2,48E+06	2,96E+06

Grupo 25%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 4	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 6	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 8	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 9	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabela A2- Dados dos valores originais (UFC/mL) em notação científica das duplicatas referentes ao microrganismo *S. mutans* nos grupos avaliados (0, 10 e 25% de PTBAEMA).

Grupo 0%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	5,00E+06	3,20E+06	4,10E+06
Espécime 2	4,20E+07	2,12E+06	2,21E+07
Espécime 3	1,24E+07	1,48E+07	1,36E+07
Espécime 4	1,48E+07	2,12E+07	1,80E+07
Espécime 5	1,92E+05	2,40E+05	2,16E+05
Espécime 6	5,00E+06	5,48E+06	5,24E+06
Espécime 7	2,00E+06	1,60E+06	1,80E+06
Espécime 8	5,60E+06	5,04E+06	5,32E+06
Espécime 9	3,60E+06	2,04E+06	2,82E+06
Espécime 10	4,80E+05	4,40E+05	4,60E+05

Grupo 10%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	3,20E+05	3,64E+05	3,42E+05
Espécime 2	1,24E+05	1,36E+05	1,30E+05
Espécime 3	1,76E+05	1,68E+05	1,72E+05
Espécime 4	8,40E+04	8,00E+04	8,20E+04
Espécime 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 6	1,80E+05	2,00E+05	1,90E+05
Espécime 7	2,88E+06	2,32E+06	2,60E+06
Espécime 8	2,80E+05	3,32E+05	3,06E+05
Espécime 9	5,20E+04	1,12E+05	8,20E+04
Espécime 10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Grupo 25%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 4	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 6	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 8	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 9	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Espécime 10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabela A3- Dados dos valores originais (UFC/mL) em notação científica das duplicatas referentes ao microrganismo *C. albicans* nos grupos avaliados (0, 10 e 25% de PTBAEMA)

Grupo 0%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	6,92E+05	7,00E+05	6,96E+05
Espécime 2	5,36E+05	4,44E+05	4,90E+05
Espécime 3	4,44E+05	5,08E+05	4,76E+05
Espécime 4	3,00E+05	2,88E+05	2,94E+05
Espécime 5	4,20E+05	3,40E+05	3,80E+05
Espécime 6	1,32E+05	1,72E+05	1,52E+05
Espécime 7	2,48E+05	2,08E+05	2,28E+05
Espécime 8	5,16E+05	5,36E+05	5,26E+05
Espécime 9	4,28E+05	5,40E+05	4,84E+05
Espécime 10	5,00E+05	3,08E+05	4,04E+05

Grupo 10%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	1,40E+06	1,28E+06	1,34E+06
Espécime 2	5,16E+05	6,60E+05	5,88E+05
Espécime 3	2,00E+06	2,20E+06	2,10E+06
Espécime 4	2,64E+05	3,08E+05	2,86E+05
Espécime 5	2,40E+05	2,08E+05	2,24E+05
Espécime 6	9,20E+04	8,40E+04	8,80E+04
Espécime 7	1,80E+06	1,48E+06	2,52E+05
Espécime 8	1,24E+06	1,20E+06	2,52E+05
Espécime 9	1,36E+05	2,20E+05	2,52E+05
Espécime 10	1,60E+06	1,24E+06	2,52E+05

Grupo 25%	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Espécime 1	3,08E+05	2,76E+05	2,92E+05
Espécime 2	3,08E+05	3,16E+05	3,12E+05
Espécime 3	3,16E+05	2,92E+05	3,04E+05
Espécime 4	2,40E+05	1,88E+05	2,14E+05
Espécime 5	3,00E+05	2,88E+05	2,94E+05
Espécime 6	1,56E+05	1,04E+05	1,30E+05
Espécime 7	1,48E+05	1,52E+05	1,50E+05
Espécime 8	2,20E+05	2,36E+05	2,28E+05
Espécime 9	2,96E+05	2,84E+05	2,90E+05
Espécime 10	1,92E+05	2,32E+05	2,12E+05

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 20 de maio de 2011.

JULIÊ MARRA