



UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



**CARINA TODA**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM  
REEMBASADOR RESILIENTE COMBINADO A UM POLÍMERO  
ANTIMICROBIANO SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME

Araraquara

2013



UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



**CARINA TODA**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM REEMBASADOR  
RESILIENTE COMBINADO A UM POLÍMERO ANTIMICROBIANO SOBRE A  
FORMAÇÃO DE BIOFILME

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Interinstitucional Novas Fronteiras - UNESP/UFAM. Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Doutor em Realibitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

Araraquara

2013

Toda, Carina

Avaliação da atividade antimicrobiana de um reembasador resiliente combinado a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme / Carina Toda.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

81 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

1. Materiais dentários
2. Reembasadores de dentadura
3. Biofilmes I. Título

**CARINA TODA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM REEMBASADOR  
RESILIENTE COMBINADO A UM POLÍMERO ANTIMICROBIANO SOBRE A  
FORMAÇÃO DE BIOFILME**

**COMISSÃO JULGADORA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR**

Presidente e Orientador: Prof Dr. Marco Antonio Compagnoni

2º examinador: Profa Dra. Ana Carolina Pero

3º examinador: Profa Dra. Janaína Habib Jorge

4º examinador: Profa Dra. Juliê Marra

5º examinador: Profa Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

Araraquara, 14 de novembro de 2013

## **DADOS CURRICULARES**

### **CARINA TODA**

NASCIMENTO: 21/07/1980- São Paulo/SP

FILIAÇÃO: Alberto Hahico Toda

Tereza Otoyoto Sakamoto Toda

1999-2002 Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP

2008-2009 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde- Curso Mestrado- Universidade Federal do Amazonas- UFAM

2011-2013 Programa de Doutorado Interinstitucional Novas Fronteiras - UNESP/UFAM. Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Áreas de Prótese. Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista- UNESP.

## DEDICATÓRIA

*Ao meu Leonardo. Minha maior criação,  
meu amor mais puro e sublime, quem dá  
sentido à minha vida.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Professor Doutor Marco Antonio Compagnoni**, meu orientador. Obrigada pela oportunidade, confiança, incentivo e paciência. Ao senhor, toda minha admiração.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, pelas bênçãos concedidas, pelas dificuldades superadas, por mais um sonho realizado.

Ao **Leonardo**, por existir. Você é o meu maior incentivador e companheirinho. Desculpe pela ausência, nada, absolutamente nada, é pior. Amo-te mais que tudo!

Aos meus amados pais **Alberto e Tereza**, que não possuem títulos de doutores, mas são meus exemplos de vida, meus melhores mestres. Obrigada pelo apoio e dedicação. Obrigada por fazerem o impossível para que tudo se torne possível.

À minha irmã amiga **Luciana**, como sempre, mesmo de muito longe, participa ativamente de todos os momentos da minha vida. A saudade é grande, mas nossos reencontros são os melhores!

Thank you **Rich**, my brother in law. You were also part of my PhD!

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

Às minhas famílias.

Família de Ribeirão Preto e Curitiba. **Tios, primos, Mariane** (minha irmã de coração) e **Francisco**, obrigada pelos momentos divertidos, foi muito bom morar pertinho novamente. Disso sim sentirei muitas saudades! Tia **Júlia**, tio **Nelson, Marcelo, Cláudia, Livia**, tio **Maçao, Cidinha** e afilhada **Sophia Rosa**.

Família de Manaus, meus irmãos que Deus colocou em minha vida. **Paola, Mateus, Grazianni, João Paulo, Olivia, Tiago, Renata, Vagner, Cristiane, Daniel** e sobrinhos queridos **João Lucas, Anna Luiza e Sofia**. Obrigada por cuidarem da minha casa, das minhas correspondências, só faltou pagar minhas contas!

À minha amiga **Fulgência**, quem me apresentou este mundo da pesquisa. Obrigada pelo carinho e pela confiança. Você é um exemplo como professora, pesquisadora, mulher, guerreira. Um dia, quero ser como você!

À **profa. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde**, diretora da Faculdade de Odontologia da UFAM. **Profa. Dra. Flávia Cohen Carneiro**, coordenadora acadêmica da FAO-UFAM. **Prof. Dr. Emílio Carlos Sponchiado Junior**, coordenador do curso de Odontologia da FAO-UFAM. Obrigada pelo apoio, confiança, incentivo e, acima de tudo, pela amizade.

Aos colegas **professores e funcionários da FAO-UFAM** que trabalharam em dobro para que o estágio doutoral fosse possível.

Aos meus **queridos alunos**, por me ensinarem e me motivarem a querer sempre aprender mais.

Aos colegas do DINTER. **José Eduardo** (meu amigo em Araraquara), **Gustavo, Ary, Aida, Pollyanna, Simone, Giorge, Daniel, Max**. Pelo convívio mais próximo, pelos momentos agradáveis.

À **Profa. Dra. Ana Carolina Pero**, por me receber de braços abertos, pela disponibilidade em ajudar sempre, pelo convívio.

Aos novos amigos **Larissa, Danny, Norberto, André, Elen, Gabriela e Andressa**. Obrigada por toda ajuda prestada, pelos momentos compartilhados.

À **Erica e Raíssa**, por toda paciência e ajuda no laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Obrigada também às demais meninas do laboratório.

À **Mara Candida Munhoz do Amaral**, Supervisora da seção técnica de pós-graduação da FOAr-UNESP, pela ajuda prestada, sempre muito atenciosa.

À **Ofélia Maria Del Duca Pierri**, supervisora de creche; **Helena Duarte Silva**, agente de desenvolvimento infantil; **Zilda Aparecida Larocca Haddad**, assistente administrativo; carinhosamente conhecidas como “tia Ofélia”, “tia Helena”, “tia Zilda” e demais “tias” do **Centro de Convivência Infantil (CCI) – UNESP - Campus de Araraquara**. Obrigada por cuidar tão bem e com tanto carinho, do meu Leonardo.

À aluna de Iniciação Científica **Juliana Dizaira** pela amizade, dedicação e auxílios prestados.

A todos os **Docentes do Programa de Doutorado Interinstitucional**, pelo carinho e ensinamentos fundamentais para o meu crescimento profissional.

Ao **Programa de Doutorado Interinstitucional Novas Fronteiras – UNESP - UFAM**.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**.

**À Universidade Federal do Amazonas e Faculdade de Odontologia da UFAM.**

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** pela bolsa de estudos, conforme Decisão N.0274/2012 do Conselho Diretor da Fapeam, por meio do Programa de apoio à formação de recursos humanos pós-graduados do estado do Amazonas – RH-Interinstitucional – Fluxo contínuo, concedida para o desenvolvimento deste estudo.

**À Secretaria do Estado de Ciência e Tecnologia** do Amazonas.

**Ao Governo do Estado do Amazonas.**

À todos que contribuíram neste doutorado, meus sinceros agradecimentos

Toda C. Avaliação da atividade antimicrobiana de um reembasador resiliente combinado a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

## **RESUMO**

Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana de um reembasador resiliente Coe Soft® (RRCS) combinado ao polímero antimicrobiano poli (2 tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) sobre formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Espécimes circulares (15mm x 3mm) do RRCS foram confeccionados (n=27), esterilizados, divididos em três grupos de acordo com as concentrações de PTBAEMA a 0% (controle), 10% e 25% e individualmente inoculados em tubos de falcon contendo 5mL de caldo RPMI para os fungos, TSB para *S. aureus* e BHI para *S. mutans* e mantidos em overnight a 37°C em incubadora com agitação orbital a 75rpm, sendo o *S. mutans* em microaerofilia. Após a inoculação dos espécimes seguiu-se a formação e maturação do biofilme a 37°C sob agitação orbital a 75rpm. Em seguida cada espécime foi transferido para tubos contendo PBS e diluições seriadas foram realizadas. Alíquotas dessas diluições foram semeadas em placas de Petri e incubadas a 37°C por 48h. Os dados obtidos foram transformados em log (UFC+1)/mL, considerando-se  $\alpha=0,05$ . 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 *S. aureus* e *S. mutans* (Kruskal- Wallis e Dunn; 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 (ANOVA;  $p > 0,05$ ). Conclui-se que os RRCS contendo 10% e 25% de PTBAEMA inibiram a formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*. Entretanto não teve efeito significativo na formação de biofilme de *C. albicans*.

Palavras-chave: Materiais dentários; reembasadores de dentadura, biofilme.

Toda C. Evaluation of antimicrobial activity of the resilient soft liner combined with antimicrobial polymer on biofilm formation [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

## ***ABSTRACT***

This study evaluated the antimicrobial activity of the resilient reliner Coe Soft ® (RRCS) combined with antimicrobial polymer poly (2-tert butylaminoethyl) methacrylate (PTBAEMA) on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilm formation. RRCS circular specimens were prepared (n=27), sterilized, divided into three groups according to PTBAEMA concentrations of 0% (control), 10% and 25% and inoculated into individual falcon tubes containing 5 mL of RPMI broth for fungi, TSB for *S. aureus* and BHI for *S. mutans* and kept overnight at 37°C with orbital shaking incubator at 75rpm, and *S. mutans* in microaerophilic. The specimens' inoculations were followed by biofilm formation and its maturation at 37°C under orbital shaking at 75rpm. After that, each sample was transferred to tubes containing PBS and serial dilutions were performed. Aliquots of these dilutions were plated in Petri dishes and incubated at 37°C for 48h. The data were transformed into log (CFU +1)/mL, considering  $\alpha = 0.05$ . The results showed that the group containing 25% of PTBAEMA inhibited completely biofilm formation of *S. aureus* and *S. mutans*. A significant reduction in counts of *S. aureus* and *S. mutans* (Kruskal- Wallis and Dunn; p = 0.001) were found in group containing 10% of PTBAEMA when compared to the values in the corresponding control groups. *C. albicans* had no significant differences between groups containing PTBAEMA and the control group (ANOVA; p> 0.05). It is concluded that the RRCS containing 10% and 25% PTBAEMA inhibited the biofilm

formation of *S. aureus* and *S. mutans*. However, no significant effect was found on *C. albicans* biofilm formation.

Keywords: Dental material, denture liners, biofilm.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Revisão da Literatura.....</b>	<b>20</b>
2.1	Biofilme.....	21
2.2	Incorporação de antimicrobiano.....	26
<b>3</b>	<b>Proposição.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Material e método.....</b>	<b>47</b>
4.1	Material.....	48
4.2	Método.....	49
4.2.1	<i>Síntese do polímero poli (2 tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA).....</i>	<i>49</i>
4.2.2	<i>Confecção dos espécimes.....</i>	<i>50</i>
4.2.3	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana sobre a formação dos biofilmes.....</i>	<i>52</i>
4.2.4	<i>Análise dos dados.....</i>	<i>59</i>
<b>5</b>	<b>Resultado.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>70</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>72</b>
	<b>Anexo.....</b>	<b>79</b>

# *1 Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de materiais reembasadores resilientes tem sido largamente indicado para cobrir a superfície interna das próteses totais ou próteses parciais removíveis que estão em contato com a mucosa oral objetivando o tratamento e condicionamento do tecido injuriado ou em casos de pós cirurgia em pacientes com prótese total imediata. Quando utilizado, esse material proporciona ao paciente conforto, reduz a fricção da prótese sobre a mucosa e diminui a transmissão de forças sobre o rebordo residual<sup>67</sup>. Embora seu uso seja uma prática cada vez mais comum é preocupante seu envolvimento na microbiota oral e na formação de biofilme<sup>4</sup>.

Os materiais reembasadores resilientes são classificados em dois tipos, os de longo prazo e os de curto prazo, de acordo com sua utilização<sup>73</sup>.

Os reembasadores resilientes de longo prazo são chamados forradores e são utilizados como medida terapêutica para os pacientes que não podem tolerar estresses induzidos pela prótese como superficialidade do nervo mentoniano, crista alveolar reabsorvida ou atrofiada e contra-indicações cirúrgicas<sup>67</sup>.

Os materiais reembasadores resilientes de curto prazo são os condicionadores de tecido. Esses materiais são de uso temporário e têm sua indicação principal em próteses totais imediatas ou de transição, durante a primeira fase de reabsorção óssea alveolar. Além disso, são também indicados para tratamento e condicionamento de tecidos irritados e/ou pós-cirúrgicos. Esses produtos apresentam propriedades elásticas e visco-elásticas que resultam numa distribuição uniforme da carga mastigatória na mucosa subjacente e no amortecimento das forças de mastigação<sup>73</sup>.

A grande desvantagem está associada à baixa efetividade de limpeza, visto que, frequentemente, pacientes relatam sabor e odor desagradáveis<sup>14</sup>, fato esse que ocorre em função de que, com o passar do tempo, o material mostra-se mais rígido e poroso, facilitando

o acúmulo de detritos alimentares e o crescimento de microrganismo, proporcionando um meio favorável ao desenvolvimento de infecções<sup>58</sup>.

Portanto a colonização de microrganismos na superfície das próteses pode induzir uma resposta inflamatória crônica na mucosa oral, caracterizada pela presença de área eritematosa que mantém contato com a prótese, denominada estomatite protética<sup>6,7,9,11,50,76</sup>.

Embora a etiologia da estomatite protética seja considerada multifatorial, a infecção por *Candida* spp., especialmente *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico<sup>19,22</sup>. Entretanto, outras espécies são frequentemente encontradas, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*, além de bactérias como *S. mutans* e *S. sanguinis* e eventualmente espécies extra-orais tais como *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. ou *Enterobacteriaceae*<sup>7,12,41,57,61</sup>.

Idade, gênero, deficiências nutricionais, antibióticos de amplo espectro, imunossupressores e alterações no mecanismo imunológico também são considerados como agentes etiológicos dessa patologia<sup>25,71</sup>.

Fatores locais associados à prótese como pobre higiene oral, trauma local causado pelo aparelho protético, seu uso contínuo e alterações no pH da saliva também são predominantes no desenvolvimento da estomatite protética<sup>18,53</sup>.

Dessa forma, na tentativa de reduzir ou evitar a proliferação de microrganismos na superfície de materiais reembasadores resilientes, 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 condicionadores de tecido<sup>3,16,23,24,30,42,43,55,72,74</sup>.

Entretanto, uma vez que o efeito antimicrobiano desses materiais se dá pela liberação gradual dos compostos 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 material<sup>2</sup>.

A incorporação de substâncias com propriedades antimicrobianas aos materiais reembasadores resilientes que não fossem liberados mantendo com isso as propriedades antimicrobianas do material seria uma alternativa.

O polímero antimicrobiano poli (2 tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) 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<sup>26,31,70</sup>. Alguns estudos sugerem a baixa toxicidade do polímero além de não causar resistência bacteriana<sup>28,52</sup>. Assim a substância vem sendo incorporada a tubos de polietileno, aço inoxidável com intuito de eliminar ou reduzir a aderência de microrganismos nas superfícies desses materiais e resultados promissores têm sido observados<sup>28,62</sup>.

Este polímero, ao ser incorporado, reage com o monômero e com isso libera grupo amino em uma das extremidades da sua cadeia polimérica, o que lhe confere uma alta atividade antimicrobiana<sup>44,45</sup>. O grupo amino causa substituição de íons cátions da membrana, seguida de desorganização e lise celular<sup>64</sup>. Assim, o contato da célula com a superfície contendo este grupo é suficiente para promover um efeito biocida<sup>62</sup>.

Estudo tem mostrado que a incorporação deste polímero em resinas de base protética causa efeito bactericida e não fungicida<sup>17,33</sup>, mas em materiais reembasadores este efeito não foi ainda estudado.

Com intuito de desenvolver uma alternativa viável para reduzir ou impedir o crescimento de microrganismos na superfície de materiais reembasadores resilientes e possibilitar melhorias na qualidade de vida de usuários de próteses removíveis quando fizerem uso desses materiais, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de

um material reembasador resiliente combinado ao polímero antimicrobiano poli (2 tert-butilaminoetil) metacrilato sobre a formação de biofilme.

A hipótese nula deste estudo foi que a incorporação do PTBAEMA (10% ou 25%) não alteraria a formação de biofilmes de três espécies de microrganismos testadas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*).

## *2 Revisão da Literatura*

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biofilme

Biofilme é uma comunidade microbiana aderida numa superfície, com células que formam microcolônias revestidas por uma complexa matriz de polissacarídeos extracelular produzida e formada em resposta a uma variedade de estímulos ambientais e físicos, tais como elevada densidade celular, nutrição e tensões físicas. Esta comunidade autossuficiente e protegida permite que o biofilme atue como um ninho de disseminação de microrganismo e infecções. O biofilme oral pode ser formado por bactérias e fungos patogênicos<sup>5,21</sup>.

Em 2001, Dolan<sup>21</sup> descreveu o processo de formação de biofilme. Bactérias e fungos patogênicos podem formar biofilmes mistos ou puros. Características do substrato tem um significativo efeito na adesão do biofilme. Em geral, maior rugosidade e hidrofobicidade, desenvolve biofilme mais rapidamente. As células aderidas à superfície se dividem, formam microcolônias e produzem uma matriz extracelular. Os canais de água encontrados na matriz transportam nutrientes e/ou oxigênio. O modo de crescimento do biofilme confere aos microrganismos uma significativa resistência aos antimicrobianos. Embora os mecanismos da formação de biofilme, crescimento e resistência microbiana tenham sido investigados, ainda existe uma necessidade de tratamentos eficazes contra microrganismos associados em biofilme.

Hornby et al.<sup>27</sup>, em 2001, isolaram e caracterizaram uma molécula extracelular Quórum Sensing (QSM) responsável pelo tamanho do inóculo de *C. albicans*. O QSM é um fenômeno mais conhecido nos organismos procarióticos, mas também tem sido sugerido nos eucarióticos, como o farnesol. Os autores identificaram a molécula extracelular farnesol que pode agir no fator de virulência da *C. albicans*. Entretanto, sua excreção pode ser diferente in

vivo e in vitro. As propriedades lipofílicas do farnesol livre podem ter sua localização favorável na membrana e assim alterar a solubilidade da membrana das células hospedeiras.

Em 2003 (Nikawa et al.<sup>40</sup>) a formação de biofilme de *Candida albicans* nas superfícies de materiais reembasadores resilientes, associado ao uso de soluções limpadoras de prótese foi estudada. Sete reembasadores resilientes (Soften, Nissin soft reverse, Mollosil, Evatouch, Tokuyama soft relining, GC denture relining, Molloplast B) sofreram deterioração artificial pela imersão em três tipos de soluções limpadoras de prótese (peróxido alcalino, peróxido neutro com enzima e enzima) durante 180 dias para que o crescimento fúngico e formação de biofilme fossem estudados. Onze espécimes de cada material foram submersos em cada solução limpadora durante 8 horas, em temperatura ambiente, e lavados abundantemente em água corrente e água destilada. Em seguida foram submersos em água destilada durante as 24 horas restante a 37°C. Esse processo foi repetido durante 180 dias. Dois espécimes, dos onze confeccionados, foram submetidos à análise de rugosidade de superfície, enquanto os outros 8 espécimes foram utilizados para o ensaio microbiológico. O pH do meio e adenosina trifosfato (ATP) foram avaliados. O estudo demonstrou que os materiais reembasadores resilientes, incluindo suas composições, mostraram inibição no crescimento de *C. albicans*, resultando num efeito inibitório sobre a colonização fúngica ou formação de biofilme. A formação de biofilme fúngico nos reembasadores deteriorados variou conforme a combinação do material resiliente e solução limpadora. A relação entre a formação de biofilme e rugosidade de superfície das amostras foi analisada. Entretanto, nenhuma correlação significativa foi observada. Os autores sugerem que o uso diário de soluções limpadoras de prótese pode promover uma formação de biofilme fúngico na superfície do material reembasador resiliente.

Park et al.<sup>48</sup> (2003) estudaram a capacidade de redução na adesão de *Candida albicans* em uma superfície modificada de resina protética. O material tem uma carga

negativa incorporada pela copolimerização do ácido metacrílico ao metil metacrilato. Quatro grupos de polimetil metacrilato (PMMA), sendo um controle e, 3 grupos de PMMA modificado (mPMMA), nas concentrações de 5%, 10% e 20% de ácido metacrílico, foram analisados. Os espécimes (11x5mm) foram colocados em uma suspensão de *C. albicans* e as células aderidas foram coradas com cristal violeta. A superfície de área de adesão foi examinada utilizando um computador de imagem com aumento de 25x. A média de porcentagem de adesão da *Candida* foi comparada entre o grupo controle e cada grupo experimental. O aumento da concentração de ácido metacrílico incorporado ao PMMA diminuiu a área de adesão de *C. albicans*, com uma redução significativa no grupo contendo 10% de ácido metacrílico, além de existir uma correlação entre a superfície de adesão do fungo e medida de ângulo de contato. O ácido metacrílico aumentou a energia de superfície da resina. Os resultados deste estudo reforçam a interação eletrostática na adesão e introdução de um método efetivo na redução de adesão de *C. albicans* em superfície de PMMA através da modificação da carga superficial de biomateriais poliméricos.

Thein et al.<sup>69</sup>, em 2006, estudaram 8 espécies de bactérias orais aeróbicas e anaeróbicas sobre a formação de biofilme de *C. albicans*. Um protocolo de formação de biofilme interagindo com a *C. albicans* foi realizado. Em seguida, o número de células viáveis foi quantificado e a ainda a formação de biofilme foi confirmada por meio de microscopia eletrônica de varredura. Resultados demonstraram que culturas de bactérias tiveram efeito sobre a formação de biofilme de *C. albicans*, onde altas concentrações de bactérias reduziram o desenvolvimento do fungo, com exceção do *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus intermedius*. Concluiu-se, de maneira quantitativa e qualitativa, que as bactérias modulam a formação de biofilme de *C. albicans* em ambientes multiespécies como a cavidade oral.

Teughels et al.<sup>68</sup> (2006) em uma revisão sistemática, avaliaram criticamente o impacto das características da superfície (energia de superfície, rugosidade, composição química do substrato) na formação de um novo biofilme, especialmente supragengival e pequena extensão subgengival. Quando um microrganismo e um substrato se encontram em um ambiente aquoso, uma película é imediatamente formada sobre a superfície do substrato. A película consiste em numerosos componentes, incluindo glicoproteínas, prolinas, fosfoproteínas, enzimas e outras moléculas, que podem funcionar como sítios de adesão (receptores) para as bactérias. *Streptococcus* e *Actynomices* são os primeiros colonizadores. Depois da formação dessa camada inicial, a formação do biofilme pode se iniciar com a multiplicação das espécies aderidas e/ou adesão de novas espécies. Concluíram que a rugosidade de superfície facilita a formação de biofilme. Além disso, o tipo (composição química) do substrato ou o tipo de cobertura superficial também influenciam em sua formação.

Em 2007, Avon et al.<sup>8</sup> avaliaram o biofilme oral in vivo utilizando uma nova metodologia para entender melhor a organização do biofilme de *Candida* da estomatite protética. Vinte e um voluntários usuários de prótese total maxilar, sendo 12 com diagnóstico de estomatite protética crônica e 9 com mucosa palatina saudável foram selecionados. Discos de resina acrílica autopolimerizável, com 3mm de diâmetro, personalizados, foram inseridos dentro de uma cavidade preparada na superfície da prótese maxilar em contato com a mucosa. Próximo ao disco de resina acrílica, um disco de papel autoadesivo foi posicionado para comparação entre as duas amostras das duas diferentes técnicas. O biofilme foi coletado em diferentes períodos de tempo (1 hora, 2 horas, 2 dias ou 1 semana) e os dados descritivos foram obtidos através do escaneamento por microscopia eletrônica. Inicialmente os autores observaram diferenças na organização do biofilme comparando-se as duas amostras, entretanto, tais diferenças tornaram-se sutis à medida que o período de observação

aumentava. Independentemente da técnica, as amostras variaram entre os participantes quanto a densidade dos microrganismos e padrão arquitetônico da estrutura do biofilme. Em geral, formação de biofilme protético foi maior quando os discos estavam localizados em áreas afetadas por estomatite protética. A nova técnica de amostragem fornece informações confiáveis com tempo controlado de formação de biofilme protético em seu ambiente natural.

Pereira-Cenci et al.<sup>51</sup> (2008) investigaram a interação entre a *C. albicans* e *C. glabrata* ou *S. mutans* em biofilmes formados em diferentes superfícies (hidroxiapatita- HA, polimetil metacrilato- PMMA e reembasador resiliente- SL), com ou sem saliva. A contagem de microrganismos viáveis da camada de biofilme acumulada foi determinada e convertida em UFC/mL. Microscopia confocal foi utilizada para caracterizar e quantificar o número de hifas dos biofilmes formados em cada condição testada. Contagem de *C. albicans* e *C. glabrata* diminuiu na ordem HA > PMMA > SL. Nos espécimes cobertos por saliva houve menor crescimento de *C. glabrata* que nos espécimes não cobertos. Glucose e presença de *S. mutans* impediu a formação de hifas de *C. albicans*. A formação de biofilme de *C. albicans* aumentou com a presença de *S. mutans* e a *C. albicans* apresentou um sinergismo com a *C. glabrata*. As duas espécies de biofilme de *Candida* foram influenciadas significativamente pela saliva, tipo de substrato e presença de outros microrganismos.

Ishijima et al.<sup>29</sup> (2012) avaliaram um microrganismo oral probiótico comensal não patogênico, *Streptococcus salivarius* K12, quanto a sua habilidade em modular o crescimento in vitro da *C. albicans*, além de sua atividade terapêutica em um modelo experimental de candidíase oral. Uma inibição no crescimento micelial da *C. albicans* foi determinada. A adição de *S. salivarius* K12 no meio RPMI em culturas de *C. albicans* diminuiu a adesão do fungo na superfície plástica da placa de Petri, numa proporção dose-dependente. Pré- culturas de *S. salivarius* K12 potencializaram a atividade inibitória de adesão da *C. albicans*. Apesar do *S. salivarius* K12 não ser fungicida, inibiu a adesão do

fungo ao substrato preferencialmente na forma de hifas que em leveduras. Para determinar o potencial anti-infeccioso atribuído ao *S. salivarius* K12 em candidíase oral, o probiótico foi administrado em ratos com candidíase oral induzida. O tratamento protegeu significativamente os ratos com a doença severa. Estes achados sugerem que o *S. salivarius* K12 pode inibir o processo de invasão de *C. albicans* em mucosas e sua adesão em superfícies de resina acrílica de próteses por mecanismos não relacionados com atividade antimicrobiana de antibióticos. Segundo os autores, o *S. salivarius* K12 pode ser útil como uma ferramenta probiótica protetora no cuidado oral e casos de candidíase.

Brusca et al.<sup>10</sup> (2013) avaliaram o mecanismo de interação microbiana entre o patógeno oral *C. albicans* e *S. mutans*. Os autores observaram que, nas condições experimentais, a concentração final de *S. mutans*, com crescimento individual, foi 5 vezes maior que a concentração final de *C. albicans* isolada. Entretanto, quando os dois microrganismos cresciam juntos, esses valores eram inversos, e a concentração final de *C. albicans* era bem mais alta que de *S. mutans*. Estes resultados mostraram que o crescimento inicial das duas espécies quando cultivadas juntas foram influenciadas de maneira positiva. Contudo, num tempo maior de incubação, a *C. albicans* previne o crescimento bacteriano e alcança concentrações 4 vezes maior que quando cultivada isoladamente. O estudo sugeriu que a formação de biofilme de *C. albicans* pode ser potencializada pela presença de *S. mutans* através de dois mecanismos: sinergismo num primeiro e curto período e competição por longos períodos.

## 2.2 Incorporação de antimicrobianos

El-Charkawi et al.<sup>24</sup>, em 1994, estudaram a incorporação de dois agentes antimicrobianos (nistatina e polinoxilina) em três materiais reembasadores (Acrostone, Raplon e Ufi-gel). A atividade antimicrobiana, as propriedades mecânicas e a composição

química foram avaliadas. A adição de nistatina a 3%, 5% e 10% apresentou efeito antimicrobiano contra *Candida albicans* durante 4, 16 e 32 semanas, respectivamente. As propriedades mecânicas avaliadas como tensão de tração, de compressão e de cisalhamento não foram afetadas pela incorporação de nistatina. Entretanto, apenas em altas concentrações (40%, 50% e 60%) de polinoxilina apresentou efeito antimicrobiano (6, 8 e 28 dias, respectivamente), além de efeitos deletérios às propriedades mecânicas avaliadas. Não houve interação química entre os materiais reembasadores e os agentes antimicrobianos testados.

Em 1994, Truhlar et al.<sup>72</sup> avaliaram in vitro a atividade antifúngica do Visco-gel e Lynal (materiais reembasadores) impregnados com diferentes concentrações de nistatina (0 U, 100.000 U, 300.000 U, 500.000 U e 1.000.000 U) durante 14 dias em meio aquoso e não aquoso. O reembasador Visco-gel com nistatina exibiu maior atividade antifúngica quando comparado ao Lynal contendo nistatina. Os reembasadores contendo nistatina apresentaram rápida redução da atividade antifúngica entre os dias 0 e 2, seguida de um platô que foi reduzindo gradualmente até perder sua atividade inibitória. Em ambiente aquoso, 1.000.000 U de nistatina são necessários para manter um nível adequado de atividade antifúngica. Além disso, os reembasadores demonstraram uma redução na atividade antifúngica proporcional ao tempo de exposição à água.

Em 1997, Matsuura et al.<sup>34</sup> pesquisaram o efeito antimicrobiano de cinco condicionadores de tecido (Visco-gel, GC Soft Liner, Fitt, SR Ivoseal e Shofu Tissue Conditioner) contendo 2% de zeólito de prata frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Espécimes medindo 10 x 10 x 2,5mm foram confeccionados e divididos em grupos com ou sem incorporação de zeólito de prata (controle). O efeito antimicrobiano dos grupos foi avaliado pela porcentagem de células viáveis (CFU) em suspensão microbiana (100µL) de solução tampão-fosfato com ou sem imersão em saliva artificial por quatro semanas. O limite que caracterizava o efeito antimicrobiano foi

determinado em 0,1% de CFU. Os condicionadores contendo zeólito de prata mostraram um efeito antimicrobiano contra *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* durante as quatro semanas estudadas.

Também em 1997, Nikawa et al.<sup>42</sup> estudaram o efeito do zeólito de prata (Zeomic®) combinado aos condicionadores de tecido GC Soft Liner e Coe Comfort, nas concentrações 0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% no crescimento e/ou produção de ácido de *C. albicans*. O efeito da incorporação desses agentes na propriedade física também foi avaliado. Os autores demonstraram que o efeito inibitório do crescimento da *C. albicans* foi dose-dependente. A propriedade física avaliada não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e aqueles que continham as diferentes concentrações de zeólito de prata. Concluíram que a adição de zeólito de prata aos condicionadores de tecido poderia auxiliar no controle de placa bacteriana formada nas próteses.

Chow et al.<sup>16</sup> (1999) incorporaram diferentes antifúngicos (nistatina, fluconazol e itraconazol) em três condicionadores de tecido (Coesoft, Viscogel e FITT) 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 no meio Sabouraud ágar das 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.<sup>31</sup>, 2001, investigaram o efeito antimicrobiano e citotóxico da adição de Microban® (triclosan) em um material reembasador. Discos (5x1mm) de PermaSoft® com e sem Microban incorporado foram confeccionados. Para a avaliação da citotoxicidade, fibroblastos de ratos foram cultivados, distribuídos em poços de placas onde foram posicionados os corpos de prova. O teste colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5difetil brometo de tetrazolina) foi realizado. O efeito antimicrobiano do Microban® foi avaliado com corpos de prova inoculados em solução com cepas de *C. albicans* a 37°C por 48 horas. Os corpos de prova foram lavados e agitados em ultrassom e as soluções resultantes foram diluídas, semeadas e incubadas a 37°C por 24 horas. O número de colônias foi contado. Os autores concluíram que a adição de Microban® não alterou a citotoxicidade do PermaSoft e também não reduziu a adesão do fungo após 24 horas.

Em 2006 Pesi-Bardon et al.<sup>52</sup> determinaram a porcentagem necessária de amônia quaternária em resina acrílica termo polimerizada para obter uma base de prótese com propriedade antissépticas. Discos de resina acrílica contendo de 0% (controle), 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de polímero amônia foram confeccionados e armazenados em saliva artificial durante quatro semanas. Os discos de resina foram incubados por 24 horas com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. O crescimento microbiano foi verificado em 0 e 24 horas. O limite para efeito antimicrobiano foi determinado em 0,1% de células viáveis. Espécimes de resina com amônia apresentaram efeito bactericida para *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 2% e para *P. aeruginosa* na concentração de 10%. Efeito fungicida para *C. albicans* na concentração de 50% foi encontrado.

No mesmo ano, Lenoir et al.<sup>32</sup> incorporaram o biocida poli (2-tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) a um polímero de baixa densidade (LDPE) e avaliaram a atividade antibacteriana frente à *E. coli* do polímero LDPE contendo 10% de PTBAEMA. Amostras de LDPE (0,5x0,5cm) modificado com PTBAEMA foram suspensas em tubos contendo solução salina estéril nas concentrações 0,2; 0,3 e 0,4g/mL. Em seguida, alíquotas de microrganismos foram inoculadas. Após 20, 60 e 120 minutos alíquotas desta suspensão foram removidas e diluídas em série para semeadura em placas de Petri para então seguir a contagem do número de células viáveis. A atividade antibacteriana do LPDE modificado também foi avaliada pelo teste de difusão em ágar. Microscopia de transmissão e varredura foi utilizada para avaliar as alterações morfológicas ocorridas nas células bacterianas testadas. Os resultados demonstraram que 0,4g do material modificado por mL eliminou todas as bactérias após 120 minutos. No teste de difusão em ágar, observou-se ausência do halo de inibição em torno das amostras de LDPE modificado com PTBAEMA, demonstrando ausência de liberação de composto ativo. Alterações estruturais nas membranas das bactérias foram observadas. Os autores concluíram que o modo de ação do PTBAEMA é através do deslocamento de íons  $Ca^{2+}$  e/ou  $Mg^{2+}$  da membrana externa da bactéria que resulta em desorganização e ruptura das células e morte do microrganismo.

Também em 2006, Seyfriedsberger et al.<sup>62</sup> estudaram a atividade antimicrobiana de superfícies de um polietileno de baixa densidade composto por um polímero biocida poly (2-tert-butilaminoetil) metacrilato em diferentes concentrações (0%; 1,5%; 3,0% e 5,0%). A atividade antimicrobiana foi avaliada 24 horas após o contato das amostras com as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL). O número de UFC/mL de *S. aureus* após 24 horas de contato entre microrganismo de todos os grupos contendo PTBAEMA foi reduzido a zero. Para *E. coli*, apenas o grupo com 5% de PTBAEMA reduziu o número de

microrganismo para zero. A formação de biofilme sobre as superfícies do polietileno foi avaliada pela mensuração de adenosina tri-fosfato (ATP) e foi detectada após 12 e 16 semanas de incubação. Os autores não observaram prejuízos às propriedades mecânicas avaliadas de acordo com o aumento da concentração de PTBAEMA.

Ignatova et al.<sup>28</sup>, em 2006, avaliaram 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, as superfícies de aço inoxidável (2 cm<sup>2</sup>) foram esterilizadas e colocadas em placas. Em seguida, uma alíquota de uma suspensão contendo 1,5 x 10<sup>8</sup> 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 ultrassom 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.

Urban et al.<sup>74</sup> (2006) estudaram a incorporação de agentes antifúngico/antimicrobiano a um condicionador de tecido (Softener, Bosworth). Os grupos formados foram: nistatina 500,000U (G1); 1,000,000U (G2); miconazol 125mg (G3) e 250mg (G4); ketoconazol 100mg (G5) e 200mg (G6); diacetato de clorexidina 5% (G7) e 10% (G8); sem nenhuma droga como grupo controle (G0). Os espécimes que continham nistatina e miconazol exibiram partículas com tamanhos e formas irregulares e distribuídos de maneira homogênea. Espécimes com ketoconazol apresentaram partículas esféricas pequenas

com ligeira distribuição na matriz. Espécimes com clorexidina incorporada exibiram partículas irregulares maiores que 50µm dispersas na matriz. Este estudo in vitro concluiu que a modificação do condicionador de tecido mostrou diferença na distribuição e tamanho das partículas dos agentes antifúngicos/ antimicrobianos.

Em 2007, Dhir et al.<sup>20</sup> propuseram a adição de uma carga aniônica à base protética para inibir a adesão de *C. albicans* e facilitar a absorção de células de defesa presentes na saliva, avaliando as propriedades físicas de uma resina acrílica para base protética. Os autores adicionaram diferentes concentrações de fosfato (10 e 20%) à uma resina acrílica experimental e avaliaram a sorção, a solubilidade em água, a estabilidade de cor e o manchamento, além de módulo e resistência à flexão. Os resultados obtidos em relação à estabilidade de cor, manchamento e solubilidade em água não foram diferenciais, porém, a análise da sorção apresentou-se aumentada; o módulo e a resistência flexural estavam diminuídos. Concluindo a pesquisa, os autores verificaram que a resina com 10% de fosfato apresenta as melhores propriedades físicas para uso.

Também em 2007, Shibata et al.<sup>63</sup> desenvolveram uma resina acrílica para reembasamento protético (Natural Resin) com propriedades antifúngicas através da adição de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e de dióxido de titânio com apatita coaptada (Ap-TiO<sub>2</sub>) em quatro concentrações diferentes (0%, 1%, 5% e 10%). As concentrações 5% e 10% apresentaram atividade biocida, diminuindo significativamente o número de microrganismos, entretanto, quanto maior a concentração de TiO<sub>2</sub> e Ap-TiO<sub>2</sub> menor era a resistência à flexão. Segundo os autores, isto ocorreu porque a adição dos produtos acarretou num aumento da quantidade de monômero residual, causando uma ação plastificante. À conclusão do trabalho foi constatado que o complexo resina acrílica/Ap-TiO<sub>2</sub> a 5% tem efeito antimicrobiano e ainda assim mantém as propriedades físicas da resina acrílica.

Thomassin et al.<sup>70</sup> (2007) incorporaram o polímero poli(2-tert-butilaminoetil) 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 as quais 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.

Em 2008 Casemiro et al.<sup>13</sup> avaliou a atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* de resina acrílica contendo diferentes porcentagens de zeólito de prata e zinco (0% - controle; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10%) e o efeito desta adição nas resinas acrílicas sobre a resistência flexural e resistência de força de impacto. Os dados mostraram que a adição de 2,5% de Iraguard B5000 (zeólito de prata e zinco) apresentou atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas. A resistência flexural e resistência à força de impacto diminuíram significativamente a partir da adição de 2,5% da substância testada. Os autores concluíram que a adição de zeólito de prata e zinco em resina acrílica apresenta atividade antimicrobiana, porém pode afetar negativamente as propriedades mecânicas, dependendo da porcentagem de zeólito incorporado.

Park et al.<sup>47</sup> (2008) investigaram dois métodos inovadores na redução da adesão de *Candida albicans* em resinas de base de prótese através da modificação de suas características de superfície, pela incorporação de uma superfície de carga e aplicação de um polímero auto adesivo nas resinas. Três grupos foram testados: controle (PMMA puro), PMMA modificado com 16% de ácido metacrílico para negativar a superfície da resina,

PMMA tratada com um polímero autoadesivo. Vinte espécimes de resina para cada grupo foram confeccionados e quatro subgrupos experimentais para cada tipo de superfície foram divididos em 2, 4, 6 e 12 dias de incubação em suspensão de *C. albicans*. A área de superfície com *C. albicans* aderida foi corada com cristal violeta e examinada calculando a porcentagem de área coberta pelo fungo. Após 2 dias, a resina modificada apresentou significativa redução nos níveis de *C. albicans* quando comparado ao grupo controle e ao grupo com o polímero auto adesivo. Entretanto, os grupos de resina modificada e com o polímero autoadesivo apresentaram menores níveis de *C. albicans* aderidas nos dias 4, 6 e 12, com diferença estatisticamente significante, quando comparado ao grupo controle. Concluiu-se que modificação nas características de superfície de biomateriais poliméricos é um método efetivo na redução de adesão de *C. albicans*.

Em 2009, Monteiro et al.<sup>36</sup>, através de uma revisão de literatura, avaliaram várias formas de incorporação de prata tais como zeólito de prata, nanopartículas de prata e íons de prata utilizadas como agente antimicrobiano frente a microrganismos e biofilme. De acordo com os autores, as características de liberação dos íons de prata dependem da natureza da prata e da matriz polimérica utilizada. Além disso, tanto a prata elementar quanto zeólitos de prata e nanopartículas de prata podem ser utilizados como biomateriais antimicrobianos para uma variedade de aplicações.

Radnai et al.<sup>56</sup> (2010) avaliaram a efetividade de um antifúngico gel incorporado a um condicionador de tecido e inibição de *C. albicans* in vitro, após armazenamento em longo período em meio aquoso. Inicialmente (1º estágio) comparou-se o efeito inibitório de gluconato de clorexidina (nas concentrações 5%, 10%, 15%, 20% e 25% v/v) e 20% v/v de miconazole incorporados em diferentes doses em discos de condicionador de tecido sobre *C. albicans*. Depois (2º estágio) avaliou-se a atividade antimicrobiana contra *C. albicans* incorporando o antifúngico gel no condicionador de tecido imerso em água

durante longo período. Como resultados foram observados que o gel de digluconato de clorexidina não inibiu o crescimento de *C. albicans*. A incorporação do miconazol apresentou um efeito inibitório dose-dependente no crescimento do fungo. A imersão dos discos em água mostrou uma relação inversa entre o tempo de imersão e o grau de inibição. Neste trabalho foi concluído que o miconazol adicionado em forma de gel no material Visco-gel tem um efeito inibitório no crescimento in vitro de *C. albicans*.

Em 2011, Paleari et al.<sup>46</sup> avaliaram o efeito da incorporação do TBAEMA em resina acrílica e a presença de grupo amina em sua superfície. Discos de resina acrílica Lucitone 550, 10 espécimes para cada grupo (1 grupo controle e mais 5 grupos com diferentes concentrações de TBAEMA- 0,5%, 1,0%, 1,5%, 1,75% e 2,0%) foram confeccionados. Os espécimes foram polidos para uma dimensão final de 65x10x3.3mm e armazenados em água destilada a 37°C por 50±2h antes dos testes. O ensaio de resistência flexural em 3 pontos foi realizado e análise estatística com ONE-WAY ANOVA e Tukey para comparação pos-hoc entre os grupos ( $\alpha=0.05$ ). A incorporação de TBAEMA na resina acrílica resultou em diferentes taxas de nitrogênio na superfície dos espécimes. A adição de 1.75% de TBAEMA mostrou altos valores de nitrogênio (0.92%). Entre os espécimes experimentais, a menor quantidade de nitrogênio encontrada foi no grupo com 0.5% de TBAEMA. No grupo controle não foi encontrado nitrogênio. Diferenças estatisticamente significante foram encontradas entre os grupos (ANOVA). O teste de Tukey para resistência flexural não mostrou diferença entre o grupo controle e o de 0.5%, sendo eles estatisticamente diferente dos grupos 1,0% e 1,5% (que foram iguais entre si e menor resistência em relação aos primeiros). O grupo 1,75% e 2.0% de TBAEMA tiveram menor resistência flexural com diferença estatisticamente significante. A adição de TBAEMA na resina acrílica promoveu uma redução em suas propriedades de resistência flexural. Concluiu-se que a presença de grupo amino na superfície de resina acrílica após a

incorporação de TBAEMA indica uma possível atividade antimicrobiana. Entretanto, determinadas concentrações podem diminuir a resistência flexural desta resina.

Acosta- Torres et al.<sup>1</sup> (2011) estudaram o polimetilmetacrilato (PMMA) para base de prótese com incorporação de nanopartículas de prata. Discos de PMMA (controle) e PMMA- com nanopartículas de prata foram confeccionados com resina acrílica comercial Nature-Cryl. O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando NIH-3T3 fibroblastos embrionários de ratos e uma sequência de células linfócitas humanas Jurkat. As células foram cultivadas por 24 e 72 horas na presença ou ausência do polímero formulado e analisado utilizando três diferentes testes, sendo eles viabilidade celular pelo ensaio 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT); proliferação pelo ensaio de ligação enzima-imunossorbância BrdU; e DNA (Comet assay). As amostras foram avaliadas mecanicamente e as amostras de polímero com nanopartículas de prata foram analisadas microscopicamente para avaliar a dispersão das nanopartículas. Os resultados mostraram que os discos de PMMA com nanopartículas de prata reduziram significativamente a adesão da *Candida albicans* e não afetaram o metabolismo ou proliferação. Concluíram que o estudo desenvolveu um novo material de PMMA biocompatível antifúngico para bases de próteses.

Em 2012, Regis et al.<sup>59</sup> investigaram as propriedades antimicrobianas e citotoxicidade do monômero methacryloyloxyundecylpyridinium bromide (MUPB) em sua forma não polimerizada, e sua incorporação em resina de base de próteses. A atividade antimicrobiana do MUPB foi testada contra espécies de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração mínima bactericida e fungicida (MFC/MBC) de MUPB foram determinadas por diluições seriadas (de 10g/L – 0.005g/L) em comparação com cetylpyridinium chloride (CPC). O efeito citotóxico do MUPB em concentração a partir de 0.01 à 1g/L foi testado por MTT em células L929 e

comparado com metil metacrilato (MMA). A atividade antimicrobiana do MUPB copolimerizado foi testada com espécimes de resina acrílica contendo três concentrações do monômero (0, 0.3, 0.6% w/w). A atividade foi quantificada pela média dos halos de inibição do teste de difusão dos discos de resina sobre os meios de cultura com 100µL de inoculo semeados na placa, e uma quantificação da adesão de células planctônicas. MUPB apresentou baixos valores de MIC quando comparado ao CPC, sendo a diferença significativa apenas para *C. dubliniensis* e *S. mutans*. MFC/MBC foram similares a todas as espécies, com exceção da *C. albicans*; neste caso MUPB apresentou valores significativamente mais altos e maior citotoxicidade que MMA para todas as concentrações testadas ( $p < 0.001$ ) exceto para 0.01g/L. Em relação a concentração incorporada nos espécimes, nenhum halo de inibição foi encontrado. A incorporação de MUPB influenciou apenas na adesão de *C. albicans*, com mais baixa contagem de UFC para o grupo 0.06%. Os autores concluíram que MUPB não polimerizado tem atividade antimicrobiana semelhante ao CPC e maior citotoxicidade quando comparado com MMA. A atividade antimicrobiana de MUPB após incorporação em resina acrílica de bases de próteses não dependeu da sua eluição, mas mostrou ser restrito para *C. albicans*.

Wady et al.<sup>75</sup> (2012) avaliaram a atividade da solução de nanopartículas de prata (AgNPs) sobre *C. albicans* e o efeito da incorporação de AgNPs em resina acrílica para base protética, a hidrofobicidade, adesão de *C. albicans* e formação de biofilme. A solução de AgNPs foi sintetizada e caracterizada por redução química. Concentração mínima inibitória (MIC) e fungicida mínima para células planctônicas (MFC) e sésseis (MFCs) foram determinadas contra *C. albicans*. Espécimes (n=360) de resina acrílica incorporadas com as nanopartículas foram confeccionados nas concentrações: 1000, 750, 500, 250 e 30 ppm e armazenadas em PBS por 0, 7, 90 e 180 dias. Resina acrílica sem AgNPs (0ppm) foram utilizadas como controle. Após o período de armazenamento, os ângulos de contato foram

medidos e os espécimes foram testados para adesão de *C. albicans* (37°C; 90 min; n=9) e formação de biofilme (37°C; 48h; n=9) pelo ensaio de redução XTT (2 metoxi 4 nitro 5 sulfonil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazólium hidróxido). A incorporação de AgNPs reduziu a hidrofobicidade da resina. Nenhum efeito na adesão e formação de biofilme foi observado. Em 90 e 180 dias de armazenamento, e apesar da solução de AgNPs ter atividade antifúngica, nenhum efeito na adesão e formação de biofilme da *C. albicans* foi observado após a incorporação da solução de nanopartícula de prata na resina acrílica de base protética.

Em 2012 Compagnoni et al.<sup>17</sup> avaliaram a atividade antimicrobiana e propriedades da superfície de uma resina acrílica (Lucitone 550) contendo o polímero biocida poli (2- tert- butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA). Os espécimes de resina confeccionados foram divididos em dois grupos (contendo 0% de PTBAEMA- controle, 10% de PTBAEMA). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo ensaio de adesão de cada microrganismo (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*). A topografia de superfície foi caracterizada por um microscópio atômico e a hidrofobicidade da superfície foi medida pelo ângulo de contato formado pela água e resina. O número de células viáveis de *S. mutans* e *S. aureus* reduziu significativamente com a incorporação de 10% de PTBAEMA. Entretanto, para *C. albicans*, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle. A incorporação de 10% de PTBAEMA aumentou a rugosidade de superfície e diminuiu o ângulo de contato. Os autores concluíram que a adição de PTBAEMA aumentou a hidrofobicidade e a rugosidade da superfície da resina acrílica e diminuiu a adesão das bactérias *S. mutans* e *S. aureus*. Porém não apresentou atividade antimicrobiana contra formação de biofilme de *C. albicans*.

Marra et al.<sup>33</sup> (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica (Lucitone 550) combinada a um polímero antimicrobiano poli (2 tert-butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA) sobre a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*,

*Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Discos de resina acrílica foram confeccionados e divididos de acordo com a concentração de PTBAEMA: 0% (controle), 10% e 25%. Os resultados mostraram que 25% de PTBAEMA inibiu completamente a formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*. Para *C. albicans* não foi encontrado diferença significativa entre os grupos testados. Concluiu-se então que a resina acrílica combinada a 10% e 25% de PTBAEMA apresentaram atividade antimicrobiana contra formação de biofilme de *S. mutans* e *S. aureus*, mas inativo contra formação de biofilme de *C. albicans*.

No mesmo ano, Nam et al.<sup>39</sup> avaliaram as características físicas e antifúngicas de uma base protética de resina acrílica combinado a nanopartículas de prata. Discos de resina acrílica foram confeccionados contendo 0% (controle); 1%; 5%; 10%; 20% e 30% de nanopartículas de prata. Cada espécime foi inoculado com alíquotas de *C. albicans* e incubado a 37°C durante 24 horas. O efeito antifúngico foi avaliado pela contagem de células viáveis. Para caracterizar os aspectos físicos, os espécimes foram testados para eluição de cátions de prata ( $Ag^+$ ) por avaliação térmica, microscopia eletrônica de varredura, dispersão de energia de raio X e estabilidade de cor. A resina acrílica modificada com a incorporação de nanopartículas de prata apresentou propriedades antifúngicas com baixa liberação de  $Ag^+$ , entretanto a estabilidade de cor deve ser melhorada para aplicabilidade clínica.

Alcantara et al.<sup>4</sup> (2012) estudaram o efeito da adição de agente antimicrobianos em um reembasador resiliente (Soft Confort, Dencril) e sua adesão a uma base de prótese (QC 20, Dentsply). Nove espécimes de resina acrílica (75x10x3 mm) foram armazenados em água destilada a 37°C durante 48 horas. As drogas em pó foram incorporadas ao pó do reembasador antes da adição do líquido do reembasador resiliente sendo os grupos: nistatina 500,000U – G2; nistatina 1,000,000U – G3; miconazol 125mg – G4; miconazol 250mg – G5; ketoconazol 100mg – G6; ketoconazol 200mg – G7; diacetato de clorexidina 5% - G8; diacetato de clorexidina 10% - G9. Um grupo (G1) sem incorporação

de droga foi utilizado como controle. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. A falha de coesão localizada no material resiliente foi predominantemente observada em todos os grupos testes concluindo que a força de adesão entre a base de resina acrílica e material reembasador resiliente modificado não foi afetada pela adição de agentes antimicrobianos.

Rodriguez et al.<sup>60</sup>, em 2012, investigaram a resistência flexural e a interação química entre o 2 tert-butilaminoetil metacrilato (TBAEMA) e a base protética de resina acrílica. Os espécimes foram divididos em cinco grupos de acordo com a concentração de TBAEMA incorporado na resina acrílica Onda-Cryl (0%- controle, 1%, 2%, 3% e 4%). Diferentes taxas de nitrogênio foram encontradas na superfície dos espécimes e uma diminuição de temperatura na fase vítrea. Concluíram que a incorporação de TBAEMA em resina acrílica resultou em copolimerização e presença de grupo amina na superfície dos espécimes. A temperatura da fase vítrea e a resistência flexural foram afetadas de acordo com a concentração de TBAEMA.

Em 2012, Chopde et al.<sup>15</sup> determinaram e compararam a atividade antifúngica de dois condicionadores de tecidos (Viscogel e CGSoft) combinados a nistatina, miconazol e fluconazol contra *C. albicans*, pelo teste de difusão em Agar, medindo-se o diâmetro de inibição de crescimento. A maior inibição foi observada no grupo contendo fluconazol seguida pelo grupo contendo miconazol e menor inibição com o grupo com nistatina. Os autores concluíram que os condicionadores de tecido quando misturados a agentes antifúngicos mostraram inibição satisfatória a *C. albicans*, podendo ser recomendado para o uso clínico.

Ainda em 2012, Monteiro et al.<sup>35</sup> avaliaram uma base de prótese contendo nanopartículas de prata coloidal, através de análise morfológica, para visualizar a distribuição e dispersão das nanopartículas no polímero e testar a liberação da prata em água deionizada

em diferentes períodos. Um teste preliminar antimicrobiano (teste de difusão de nanopartículas de prata coloidal e de contato) e um mecânico (resistência flexural em MPa) foram realizados. Nanopartículas de prata foram sintetizadas por redução de nitrato de prata com citrato de sódio. A resina acrílica (Lucitone 550) foi preparada e suspensão de nanopartículas foi incorporada ao monômero da resina em diferentes concentrações (0,05%; 0,5% e 5% de prata coloidal). O grupo controle foi de resina sem as nanopartículas. Os espécimes foram armazenados em água deionizada a 37°C por 7, 15, 30, 60 e 120 dias. Cada solução foi analisada com espectrofotômetro de absorvância atômica. Não houve diferença na resistência flexural. Os resultados mostraram que os nanocompostos tiveram boa eficácia contra *C. albicans*, especialmente o PMMA/Ag contendo 5% de nanopartículas de prata coloidal. A prata não foi detectada na água deionizada independente da adição de nanopartículas nas resinas e nos períodos analisados. Micrográfico mostraram que com baixas concentrações, a distribuição de nanopartículas de prata foi reduzida, ao passo que sua distribuição foi melhorada no polímero. Além disso, após os 120 dias de armazenamento, nanopartículas foram localizadas principalmente na superfície dos espécimes de nanocompostos. A incorporação de nanopartículas de prata em resina acrílica foi evidente. Nanopartículas de prata foram incorporadas em PMMA resina protética para obter um efeito antimicrobiano do material e ajudar no controle de infecções comuns envolvendo tecido da mucosa oral em usuários de próteses totais.

Em 2013 Monteiro et al.<sup>38</sup> estudaram o efeito de diferentes concentrações de nanopartículas de prata (NP) na composição da matriz e estrutura do biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata*. O biofilme de *Candida* foi formado em seis poços de placas durante 48 horas para então serem expostos a 13,5µg/mL e 54µg/mL de NP durante 24 horas. Após este período matrizes extracelular foram extraídas dos biofilmes e analisados quimicamente quanto a proteínas, carboidratos e DNA. Microscopia eletrônica de varredura e microscopia

de epifluorescência foram utilizados para investigar a estrutura de biofilme. Os autores observaram que as NP interferiram na composição da matriz do biofilme de *Candida* em termos de proteínas, carboidratos e DNA, com exceção do teor de proteína da *C. albicans*. A microscopia eletrônica de varredura revelou que o biofilme de *C. albicans* tratado com NP apresentou diferenças estruturais quando comparadas com o grupo controle. Além disso, NP mostrou uma tendência de aglomeração no biofilme. As imagens de microscopia de epifluorescência sugeriram que NP gerou um dano à parede celular da *Candida* isolada. Concluíram que, independente da concentração, NP afetou a composição e estrutura do biofilme de *Candida* podendo estar relacionado ao mecanismo de ação biocida da nanopartícula.

Em 2013, Sodagar et al.<sup>65</sup> estudaram o efeito de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{SiO}_2$  na resistência flexural de resinas acrílicas (poli metil metacrilato). Espécimes de resina acrílica (Selecta Plus) foram confeccionadas ( $5 \times 10 \times 3 \text{mm}$ ) e divididos em 7 grupos: AR contendo nano  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$  com  $\text{SiO}_2$  em duas concentrações de 1% e 0,5%, e ainda um grupo controle. As nanopartículas foram incorporadas ao monômero. Todos os espécimes foram armazenados em água destilada a  $37^\circ\text{C}$  e submetidas ao teste de resistência flexural, sendo o padrão limite mínimo estabelecido por ISO 20795-1 (2008). A incorporação de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{SiO}_2$  em resinas acrílicas podem provocar efeitos adversos na resistência flexural do produto final. Esse efeito está diretamente relacionado com a concentração de nanopartículas.

Queiroz et al.<sup>54</sup>, 2013 avaliaram o efeito de filmes de carbono tipo diamante com e sem nanopartículas de prata recobrimo o polimetil metacrilato (PMMA) sobre formação de biofilme de *Candida albicans*. Os espécimes foram divididos em grupo e os filmes foram depositados. A formação de biofilme de *C. albicans* foi significativamente influenciada pelos filmes reduzindo o número de unidade formadora de colônia (CFU). Os

autores concluíram que bases protéticas de PMMA recobertas por filme de carbono tipo diamante com ou sem nanopartículas de prata pode ser uma alternativa na prevenção de candidíase em pacientes usuários de próteses.

No mesmo ano Monteiro et al.<sup>37</sup> avaliaram ainda a eficácia antifúngica de nanopartículas de prata (NP) combinadas com nistatina (NYT) ou digluconato de clorexidina (CHG) contra biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata*. A droga sozinha ou combinada com SN foi aplicada ao biofilme maduro (de 48 horas) e após 24 horas de tratamento sua atividade antibiofilme foi avaliada pela quantificação total de biomassa e contagem de colônias formadas. A estrutura do biofilme da *Candida* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que nanopartículas de prata combinadas com nistatina ou digluconato de clorexidina apresentaram sinergismo na atividade antibiofilme e esta atividade dependeu da espécie e da concentração de droga utilizada. Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que algumas combinações de droga foram capazes de romper o biofilme de *Candida*. Este estudo sugeriu que a combinação de NP com NYT ou CHG pode ter implicações clínicas no tratamento de estomatite protética.

Sivakumar et al.<sup>64</sup>, em 2013, avaliaram a incorporação de macromoléculas antimicrobianas em resinas acrílicas polimetil metacrilato (PMMA). O artigo descreve as características básicas de um potencial polímero antimicrobiano (polímeros biocidas), formulações (PMMA modificado) e consideram sua aplicabilidade, status biológico e potencial utilização para os próximos anos. Os autores concluíram que a base protética de PMMA modificado contendo um polímero biocida ou biocida liberado apresenta boa propriedade antimicrobiana in vitro, entretanto causam efeitos tóxicos. As implicações das macromoléculas antimicrobianas sobre a saúde e o ambiente devem ser avaliados por completo para que os produtos possam ser colocados no mercado. No entanto, a otimização

da formulação do PMMA antimicrobiano e exploração de seu uso clínico pode tornar-se substancialmente melhor no futuro.

Em 2013, Lazarin et al.<sup>30</sup> investigou o efeito de coberturas experimentais fotopolimerizáveis contendo zwitterionic ou monômeros hidrofílicos, na hidrofobicidade das resinas acrílicas para base protética e a adesão de *C. albicans*. Espécimes de acrílico foram preparados com superfícies rugosas e lisas, ambos os lados foram deixados sem tratamentos (grupo controle) ou foram revestidos com as seguintes coberturas: 2- hidroxietil metacrilato (HE); 3-hidroxipropil metacrilato (HP); 2-trimetilamonium etil metacrilato clorídrico (T) e sulfobetamine metacrilato (S). As concentrações dos monômeros foram 25%, 30% ou 35%. Metade dos espécimes de cada grupo (controle e experimental) foi coberto com saliva e a outra metade não. A energia de superfície de todos os espécimes foi medida, independentemente da condição experimental. A adesão de *C. albicans* foi avaliada para todos os espécimes. O teste de adesão foi realizado pela incubação dos espécimes em suspensão de *C. albicans* ( $1 \times 10^7$  células/mL) a 37°C por 90 minutos. O número de células aderidas foi avaliada pelo ensaio de XTT. Os resultados para a superfície rugosa com cobertura S (30% ou 35%) e HP (30%) resultou em menores valores de absorbância em relação ao grupo controle. Essas coberturas exibiram maior superfície hidrofílica que o grupo controle. A rugosidade aumentou a adesão apenas no grupo controle e a saliva não teve influência na adesão. A análise de espectroscopia fotoelétron (XPS) confirmou a mudança química dos espécimes experimentais, principalmente para as coberturas com S e HP. Os autores concluíram que coberturas com S e HP reduziram significativamente a adesão de *C. albicans* na resina acrílica e pode ser considerado como um potencial tratamento preventivo para estomatite protética.

## *3 Proposição*

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de um material reembasador resiliente combinado ao polímero antimicrobiano poli (2 tert-butilaminoetil) metacrilato sobre a formação, *in vitro*, de três biofilmes monoespécies (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*).

## *4 Material e Método*

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 MATERIAL

Para a realização deste estudo foram utilizados o material e aparelhos descritos abaixo.

- Espátula de aço nº 36 Duflex SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Pinça clínica de aço Duflex SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- luva, mascara e gorro, Descarpack, São Paulo, SP, Brasil.
- Lâminas de vidro
- Material reembasador resiliente Coe Soft, CG America, Tóquio, Japão.
- Poli (2- tert- butilaminoetil) metacrilato (PTBAEMA).
- Balança de precisão eletrônica Bel Engineering Monza, Itália.
- Embalagens plástica estéril com tarja 750mL, produzidas por Labplas, Ste-Julie, Quebec, Canadá.
- Cultura de *Candida albicans* ATCC 90028.
- Cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Cultura de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Tryptic Soy Broth (TSB), Acumedia, Estados Unidos da América.
- Brain-heart infusion (BHI), Himedia, Índia.
- Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com cloranfenicol, Himedia, Índia.

- Mannitol Salt Agar , Himedia, Índia.
- Mitis Salivarius Agar com bacitracina, Difco, Estados Unidos da América.
- Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
- Solução salina tamponada com fosfato 0,1M; pH 7,1 (PBS)
- Agitador de tubos, AP-56 Phoenix, Araraquara, SP, Brasil.
- Espectrofotômetro, CMC Laboratório Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Placa para cultura celular de 12 orifícios, Costar, Corning Incorporated, Nova Iorque, Estados Unidos da América.
- Incubadora com agitação orbital, Quimis , Diadema, SP, Brasil.
- Tubos para centrífuga em polietileno estéril, Corning Incorporated, Nova Iorque, Estados Unidos da América.
- Eppendorf, Axygen, Corning Incorporated, Nova Iorque, Estados Unidos da América.
- Centrífuga 5810R, Eppendorf do Brasil Ltda, 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.

## 4.2 MÉTODO

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

A síntese do 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.<sup>66</sup>.

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



#### 4.2.2 Confeção de espécimes

Discos de RRCS (n=27) foram confeccionados a partir de uma matriz metálica (Figura 2) apresentando em seu interior 10 orifícios com 15mm de diâmetro e 3mm de espessura posicionada sobre uma placa de vidro. O RRCS foi preparado conforme indicação do fabricante e acomodado nos orifícios da matriz metálica. Para criar uma superfície lisa e regular, outra placa de vidro foi posicionada sobre a matriz metálica.

Após a obtenção dos espécimes, os mesmos foram esterilizados por meio de Luz Ultra Violeta. Inicialmente os espécimes foram acomodados em uma placa de vidro estéril e submetidos a luz UV durante 30 minutos, em seguida, com auxílio de uma espátula de aço estéril, os espécimes foram vertidos em uma nova placa de vidro estéril para que o outro lado fosse submetido a luz UV por 30 minutos. Os espécimes foram então armazenados em embalagens plásticas estéril (Figura 3).

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 do material reembasador resiliente Coe Soft (RRCS) - 5,3g de pó para 5,0 mL do monômero. A quantidade de PTBAEMA adicionada foi calculada em proporção a massa de pó do RRCS (Tabela 1). Primeiramente o PTBAEMA foi acrescentado ao pó do RRCS, após homogeneização, a quantidade de monômero em proporção para a massa final de pó e PTBAEMA foi em seguida acrescida lentamente à mistura.

Tabela 1 - Grupos de acordo com a porcentagem de PTBAEMA.

<b>Porcentagem de PTBAEMA (%)</b>	<b>Pó RRCS (g)</b>	<b>PTBAEMA (g)</b>	<b>Monômero RRCS (mL)</b>
0	5,3	-	5,0
10	5,3	0,53	5,5
25	5,3	1,32	6,2

Figura 2 - Matriz metálica

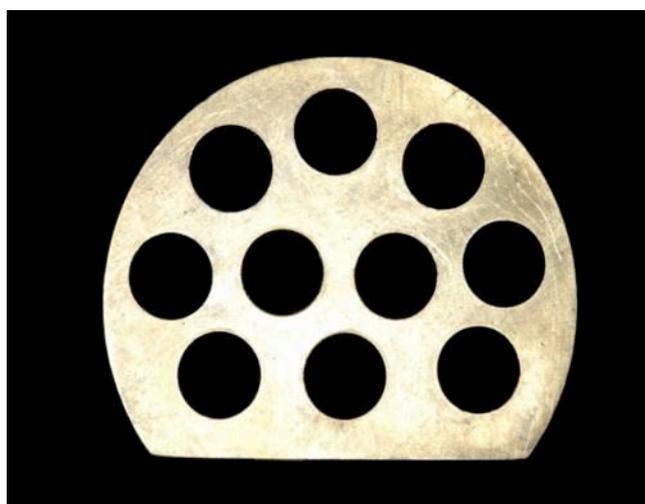
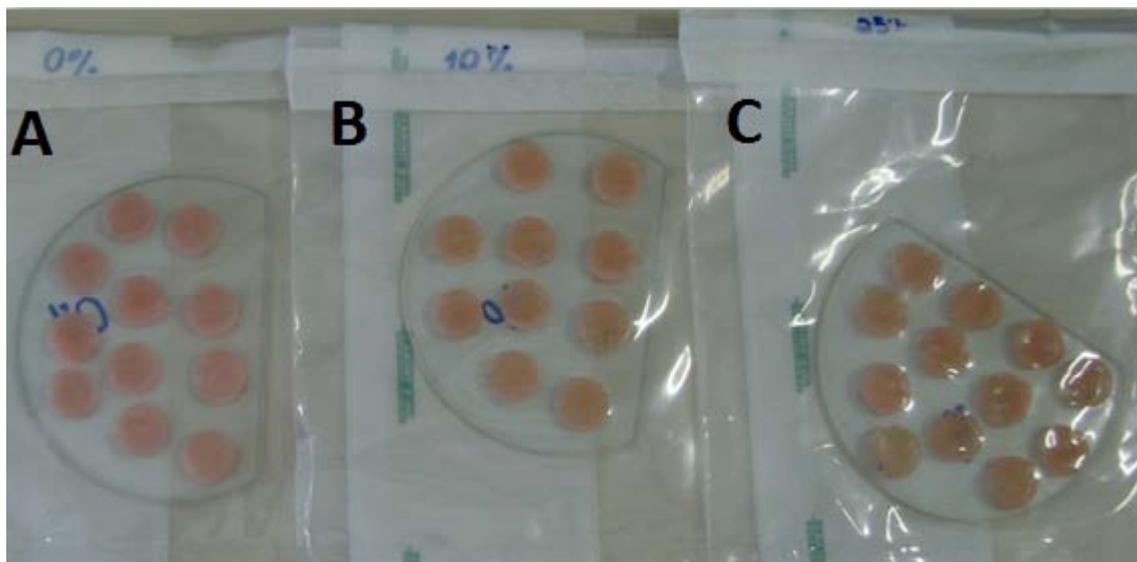


Figura 3 - Espécimes armazenados após a esterilização (A - 0%, B - 10% e C - 25% de PTBAEMA incorporado ao RRCS)



#### 4.2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana sobre a formação de biofilmes

Os procedimentos descritos abaixo foram realizados no Laboratório de Microbiologia, Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Anexo 1).

#### ***Preparo dos materiais microbiológicos***

Os microrganismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* foram descongelados e semeados em placas de Petri com meio específico para cada microrganismo, Sabouraud Dextrose Agar para a *C. albicans*, Manitol Salt Agar para *S. aureus* e Mitis Salivarius com Bacitracina para *S. mutans*. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para reativação dos microrganismos.

Em seguida uma alíquota de duas alçadas de cada microrganismo foi inoculado em tubos de falcon contendo 5mL de caldo RPMI para os fungos, TSB para *S.*

*aureus* e BHI para *S. mutans* e mantidos em overnight a 37°C em incubadora com agitação orbital a 75rpm, sendo o *S. mutans* em microaerofilia.

### ***Formação do biofilme***

Após o overnight, os tubos de falcon contendo os microrganismos foram colocados em Centrífuga a 4000 rpm durante 5 minutos para observar crescimento dos microrganismos no fundo dos recipientes. Em seguida foram realizadas duas lavagens com PBS seguido da centrifugação da solução, para remoção das células inviáveis, e ressuspensão das células com caldo RPMI para *C. albicans*, TSB para *S. aureus* e BHI para *S. mutans* até atingir uma turvação correspondente a uma suspensão microbiana de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL. A densidade optica (D.O.) foi monitorada em espectrofotômetro utilizando um filtro de absorbância de 600nm para as bactérias e 540nm para a levedura (Figura 4).

Figura 4 - Espectrofotômetro para monitoramento da turvação da suspensão por densidade óptica (DO).



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 (RPMI, TSB ou BHI) contendo uma alíquota correspondente a  $10^7$  UFC/mL de cada microrganismo testados. (Figuras 5 e 6). 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 7) e em microaerofilia para *S. mutans*, com a finalidade de promover a adesão dos microrganismos na superfície dos espécimes<sup>69</sup>.

Figura 5- Inoculação dos espécimes



Figura 6 - Espécimes com 0%, 10% e 25% de PTBAEMA incorporado em meio contendo aproximadamente  $10^7$  UFC/mL do microrganismo a ser testado.

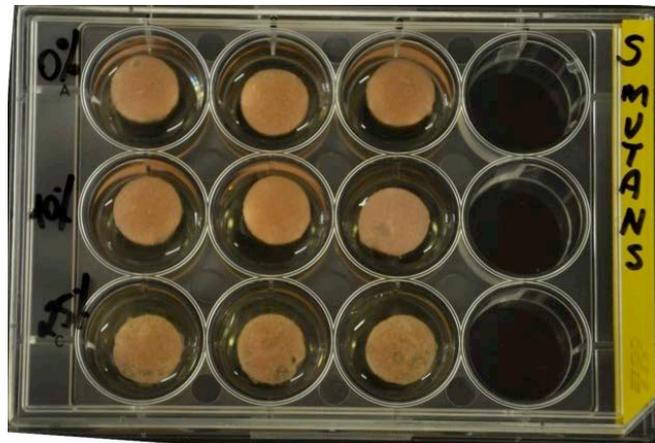


Figura 7 - Incubadora com agitação orbital utilizada no estudo (Incubadora Quimis)

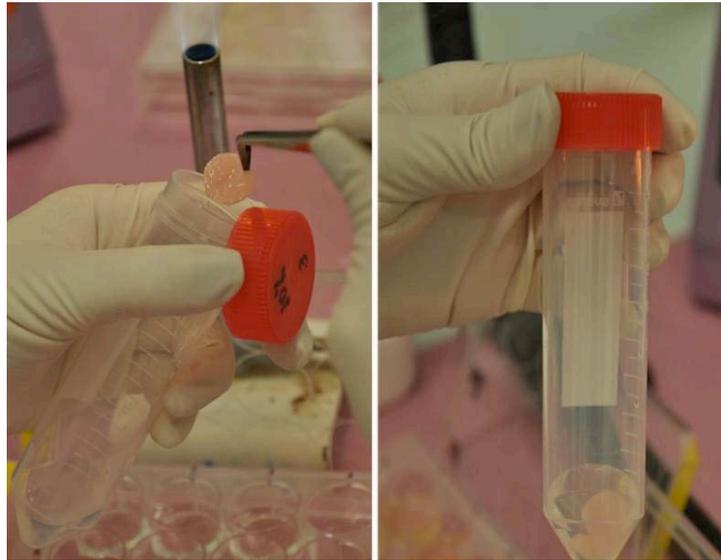


Após este período, cada espécime foi lavado com PBS, de maneira cuidadosa e por dois períodos, a fim de remover os microrganismos fracamente aderidos na superfície dos espécimes.

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 (RPMI, TSB ou BHI) e incubados a 37°C por 48 horas e em microaerofilia para *S. mutans* em incubadora sob agitação de 75 rpm, a fim de promover a maturação do biofilme<sup>69</sup>.

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<sup>33</sup> (Figura 8).

Figura 8- Transferência de cada espécime para tubo com tampa de rosca contendo 4,5 mL de solução salina.



Os tubos com tampa de rosca contendo os espécimes foram agitados por 1 minuto em vortex para desprender qualquer célula microbiana aderente do espécime para a solução resultante<sup>49</sup> (Figura 9).

Figura 9 - Agitação por 1 minuto em Vortex para desprendimento das células aderidas aos espécimes.



Posteriormente, as diluições seriadas foram realizadas a partir dessa solução resultante. Para isso, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução resultante foi pipetada e transferida para um eppendorf contendo 900  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril. Este último tubo foi agitado vigorosamente em vortex e uma nova alíquota de 100 $\mu\text{L}$  foi removida do mesmo e colocada em outro eppendorf contendo 900 $\mu\text{L}$  de solução salina. Esse procedimento foi realizado sete vezes para cada espécime e, dessa forma, as diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  foram obtidas.

As diluições seriadas 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  $\mu\text{g/mL}$  de cloranfenicol para *Candida albicans* e Mitis Salivarius com Bacitracina para *Streptococcus mutans*. Para este procedimento, os eppendorfs contendo as diluições seriadas foram individualmente agitados em agitador vortex. Em seguida, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição seriada foi semeada em duplicata em uma placa de Petri contendo o meio de cultura específico para cada microrganismo (Figura 10). As placas referentes aos grupos experimentais foram igualmente submetidas à incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas e em microaerofilia para *S. mutans*<sup>75</sup>.

Para cada microrganismo o ensaio microbiológico foi realizado em três ocasiões diferentes.

Figura 10 - Semeadura em Placa de Petri com meio específico para cada espécie microbiana



### *Contagem de colônias*

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri foram submetidas à contagem de colônias. O número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{no.Colônias \times 10^n}{q}$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas. No presente estudo, q= 0,010 já que foram pipetados 10 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. Em seguida, os dados obtidos para as contagens foram transformados de acordo com a fórmula  $\log(UFC+1)/mL$ .

#### *4.2.4 Análise dos dados*

A hipótese nula deste estudo foi que a incorporação do PTBAEMA (10% ou 25%) não alteraria a formação de biofilmes das três espécies de microrganismos testadas.

O teste de Shapiro Wilk foi utilizado para avaliar a distribuição normal da variável dependente e teste de Levene para avaliar homogeneidade de variância das amostras. Os valores encontrados para *S. aureus* e *S. mutans* não aderiram à distribuição normal ( $p < 0,05$ ) e não foi observada homogeneidade de variância para as duas espécies de bactérias testadas ( $p < 0,05$ ). O teste não paramétrico foi então aplicado.

Os resultados encontrados para *S. aureus* e *S. mutans* foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn. Os resultados encontrados para *C.*

*albicans* foram comparados pelo teste de Análise de Variância um fator (ANOVA). Todos os testes estatísticos foram empregados obedecendo-se a um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05.

As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferenciais foram executadas com o software PASW Statistics (v. 19, SPSS Inc, Chicago, IL). Consideraram-se estatisticamente significativos os efeitos cujo p-value foi inferior ou igual a 0,05.

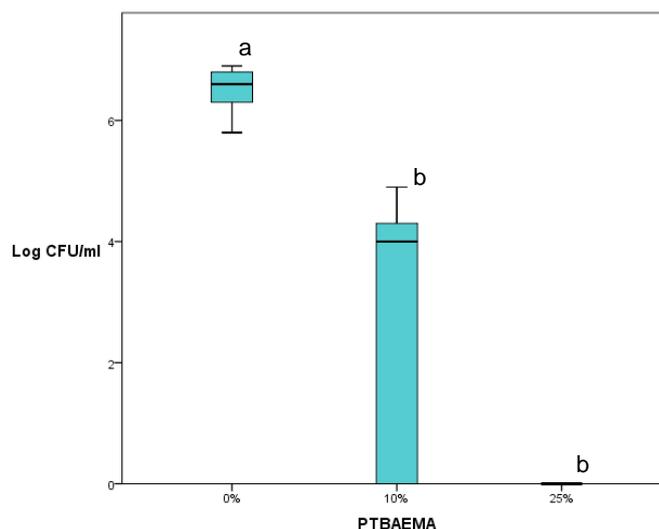
## *5 Resultado*

## 5 RESULTADO

Os valores de log (UFC+1)/mL para *S. aureus*, *S. mutans* estão representados nos Gráficos 1 e 2, respectivamente. Já os valores de log (UFC+1)/mL de *C. albicans* está representado pela Tabela 2.

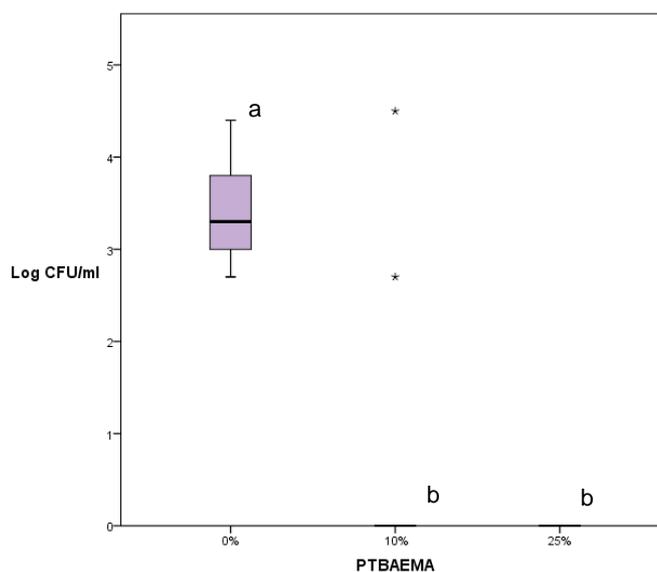
No Gráfico 1 pode-se observar que o grupo contendo 25% de PTBAEMA inibiu totalmente a formação de biofilme de *S. aureus* sobre os espécimes ( $p < 0,05$ ) reduzindo a zero o número de células viáveis desta espécie. A concentração de 10% de PTBAEMA no RRCS avaliado reduziu de forma significativa a formação de biofilme de *S. aureus* quando comparado ao grupo controle ( $p = 0,001$ ). Quando os grupos contendo 10% e 25% de PTBAEMA foram avaliados entre si, houve uma redução maior na contagem de células viáveis para o grupo de 25%, porém sem diferença estatisticamente significativa (teste de Dunn;  $p > 0,05$ ).

Gráfico 1 - Contagens de células viáveis de biofilme de *S. aureus* formado sobre os espécimes contendo diferentes concentrações de PTBAEMA. (teste de Kruskal Wallis,  $p = 0,001$ )



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 de células viáveis de biofilme de *S. mutans* formado sobre os espécimes contendo diferentes concentrações de PTBAEMA. (teste de Kruskal Wallis,  $p=0,001$ ). Os asteriscos representam os espécimes que apresentaram biofilme aderido sobre sua superfície.



Na Tabela 2, observa-se que os espécimes de RRCS combinado ao PTBAEMA não apresentou efetividade no controle de biofilme de *C. albicans* visto que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos contendo PTBAEMA (10% e 25%) e o grupo controle em relação ao número de células viáveis (teste de ANOVA,  $p=0,548$ ).

Tabela 2 - Média (Desvio-padrão) em log(UFC+1/mL) do número de células viáveis de biofilme de *C. albicans* formado sobre os espécimes contendo diferentes concentrações de PTBAEMA. (ANOVA,  $p>0.05$ )

Group	0%	10%	25%
<i>C. albicans</i>	5.14 ( $\pm 0.24$ )	5.22 ( $\pm 0.13$ )	5.26 ( $\pm 0.20$ )

## *6 Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo incorporou o polímero PTBAEMA ao RRCS. Após a síntese do PTBAEMA e sua incorporação no RRCS nas concentrações de 0%, 10% e 25%, avaliou-se a capacidade desta combinação em inibir a formação de biofilmes de *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*.

Os resultados encontrados demonstraram que o material reembasador contendo 10% de PTBAEMA reduziu significativamente o número de células viáveis de *S. aureus* e *S. mutans* na superfície dos espécimes quando comparados ao grupo controle (0% de PTBAEMA).

Completa inibição na formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans* foi observada no grupo contendo 25% de PTBAEMA. Em 2006, Seyfriedsberger et al.<sup>62</sup> também encontraram propriedades antimicrobianas, em menor concentração, no polietileno com PTBAEMA incorporado. O resultado apresentado foi uma redução à zero na contagem de UFC/mL de *S. aureus*, após 24 horas de contato com o grupo contendo o polímero antimicrobiano. Outros autores também relataram a atividade antimicrobiana do PTBAEMA<sup>28,32,70</sup>.

Resultados semelhantes foram descritos por Compagnoni et al.<sup>17</sup> (2012) que demonstraram que a incorporação de PTBAEMA em resinas acrílicas diminuiu a adesão de biofilme de *S. mutans* e *S. aureus* na superfície de próteses, mas não exibiram efeito antimicrobiano contra *C. albicans*.

Marra et al.<sup>33</sup> (2012) relataram que a resina acrílica combinada com 10% e 25% de PTBAEMA mostraram significante atividade antimicrobiana contra formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*.

As espécies bacterianas testadas, *S. aureus* e *S. mutans* são classificadas como bactérias gram-positivas e, portanto apresentam as mesmas características, o que justifica terem apresentado comportamentos parecidos frente às condições experimentais avaliadas neste estudo.

A incorporação do PTBAEMA pelo monômero resulta em copolimerização que permite que o grupo amino alcance a superfície da resina acrílica. A carga do grupo amino do PTBAEMA substitui cátions divalentes (íons  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) da membrana externa da bactéria que resulta em desorganização e ruptura das células e morte do microrganismo<sup>32,64</sup>.

No presente estudo, o desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* sobre a superfície do material reembasador não apresentou diferença entre os grupos controle, 10% e 25% de PTBAEMA assim como nos resultados encontrados por Compagnoni et al.<sup>17</sup> (2012) e Marra et al.<sup>33</sup> (2012), os quais realizaram a incorporação de PTBAEMA em resinas acrílicas termopolimerizáveis. Diferentes concentrações de PTBAEMA não reduziram o número de UFC/mL de *C. albicans*.

Entretanto, Park et al.<sup>47</sup>, em 2008, ao incorporar ácido metacrílico a uma resina acrílica para base protética observaram redução no número de *C. albicans* aderidas.

Esta divergência de resultados pode estar relacionada com a capacidade de interação de cada agente com a parede que envolve as células fúngicas. Essa parede celular oferece proteção química e mecânica ao fungo. No caso das *C. albicans*, elas são responsáveis pela interação inicial com as células hospedeiras ou superfícies. Os constituintes básicos da parede celular fúngica são os glucanos, quitina e manoproteínas. As paredes celulares formam uma camada estrutural com a camada externa composta principalmente por manoproteínas e a interna por glucanos. Sendo assim, especula-se que as manoproteínas são responsáveis pela interação inicial com a superfície polimérica, devido a sua posição<sup>48</sup>. As

manoproteínas são essencialmente polipeptídeos glicosados que transportam vários grupos N-glicanos com cadeia exterior de manose. A fosforilação dessas cadeias contribui para a superfície aniônica da levedura.

Dessa forma, o ácido metacrílico utilizado por Park et al.<sup>47</sup> (2008) propiciou 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*, reduzindo a quantidade de células fúngicas aderidas à superfície.

Baseando-se neste raciocínio, a superfície do RRCS contendo PTBAEMA apresentaria carga positiva devido à 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.

Um fator limitante deste estudo é a avaliação da capacidade de inibir a formação de biofilme de espécies individualmente, ao invés de investigar a atividade antimicrobiana do PTBAEMA sobre a formação de biofilme misto, contendo espécies fúngicas e espécies bacterianas aeróbias e anaeróbias, o que representaria as condições mais próximas àquelas encontradas na cavidade bucal.

Vários estudos reforçam que a cavidade oral não é colonizada e infectada apenas por um único microrganismo, mas por uma complexa comunidade microbiana estruturada. São mais de 500 espécies de microrganismos que compõe a microflora oral com a formação de película, dinamismo de temperatura, nutrição, tipo de substrato e saliva que explicam a formação de um biofilme<sup>8,51,68</sup>.

In vivo, a presença de saliva condiciona a formação da película adquirida formada principalmente por material proteico do ambiente aquoso ao qual o substrato está

submetido. Esta película favorece a adesão inicial de bactérias e fungos que posteriormente ficam envolvidos por uma matriz extracelular formando o biofilme<sup>8,21</sup>.

O processo de colonização e formação de biofilme inclui adesão, crescimento e co-adesão. A adesão e co-adesão são regulados por fatores não específicos com interações hidrofóbicas e eletrostáticas<sup>40</sup>. A adesão inicial começa com bactérias, principalmente *Streptococcus* e *Actinomyces*. Após a formação de uma monocamada a formação de biofilme começa com a multiplicação das espécies aderidas e da adesão de novas espécies de fungos e bactérias<sup>68</sup>.

Apesar do processo de colonização 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 extracelular de polissacarídeo e facilitando a adesão de outros microrganismos, como por exemplo, de *C. albicans*<sup>68</sup>.

Além disso, alguns autores observaram que a presença de *S. mutans* aumentou a formação de biofilme de *C. albicans*<sup>10,51,69</sup>. Durante a fase inicial de colonização um processo de sinergismo benéfico acontece entre *S. mutans* e *C. albicans*. Brusca et al.<sup>10</sup> (2013) relataram que em cultura mista a *C. albicans* aumentou o seu crescimento na fase exponencial e se manteve em altas concentrações na fase estacionária na presença de *S. mutans*.

Por um mecanismo chamado “quorum sensing” as células microbianas respondem à sua densidade populacional ou outros estímulos externos que regulam a expressão gênica e diferenciação celular. Quorum sensing envolve a produção, secreção e resposta a pequenos sinais moleculares conhecidos como autoindutores. Inicialmente este mecanismo era conhecido apenas em bactérias, posteriormente, o farnesol foi descoberto

como um quórum sensing molecular em *C. albicans*<sup>10,27</sup>. Por este mecanismo a interação e formação de biofilme *C. albicans* e *S. mutans* podem ser influenciados de forma induzida ou reduzida.

Ishijima et al.<sup>29</sup> (2012) sugeriram que *S. salivarius* K12 pode inibir o processo de adesão de *S. mutans* sobre superfícies acrílicas de próteses por um mecanismo não associado a atividade antimicrobiana. A redução significativa do biofilme de *S. mutans* foi observada no presente estudo e, talvez um ensaio microbiológico com biofilme multiespécie de *C. albicans* e *S. mutans* poderia alterar a estrutura do biofilme formado na superfície do material com PTBAEMA.

Apesar de não inibir a formação de biofilme de *C. albicans*, os resultados da incorporação do PTBAEMA ao RRCS testado podem ser considerados promissores, uma vez que apresentou propriedade bactericida. O que justificaria sua aplicabilidade na clínica odontológica, como um auxiliar no controle de infecção de microrganismo uma vez que o material, com o passar do tempo, torna-se rígido e poroso, aumentando sua dificuldade de higienização e, conseqüentemente, o aparecimento de inflamações crônicas, como estomatite protética.

Entretanto, mais investigações teóricas e experimentais sobre o polímero PTBAEMA serão necessárias para elucidação de suas propriedades e comprovação de sua aplicabilidade clínica. Assim, outros estudos deverão ser conduzidos para determinar, por exemplo, a citotoxicidade deste material.

## *7 Conclusão*

## 7 CONCLUSÃO

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

1) O condicionador de tecido Coe Soft GC America contendo 10% e 25% de PTBAEMA apresentou efeito antimicrobiano na formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*;

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

## *Referências*

## REFERÊNCIAS\*

1. Acosta-Torres LS, Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Cajero-Juárez M, Castaño VM. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for denture. *Int J Nanomed.* 2012; 7(3): 4777-86.
2. 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(2): 131-42.
3. Akiba N, Hayakawa I, Keh ES, Watanabe A. Antifungal effects of a tissue conditioner coating agent with TiO<sub>2</sub> photocatalyst. *J Med Dent Sci.* 2005; 52(4): 223-7.
4. Alcantara CS, Macedo AFC, Gurgel BCV, Jorge JH, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel bond strength of resilient liner modified by the addition of antimicrobial agents to denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(6): 607-12.
5. Alnuaimi AD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS Yeast Res.* 2013; 13(7): 689-99.
6. Altarawneh S, Bencharit S, Mendonza L, Curran A, Barrow D, Barros S, et al. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow and dry mouth. *J Prosthodont.* 2013; 22(1): 13-22.
7. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987; 14(3): 217-27.
8. Avon SL, Goulet JP, Deslauriers N. Removable acrylic resin disk as a sampling system for study of denture biofilms in vivo. *J Prosthet Dent.* 2007; 97(1): 32-8.
9. 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(2): 111-2.
10. Brusca MI, Irastorza RM, Cattoni DI, Ozu M, Chara O. Mechanisms of interaction between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: an experimental and mathematical modeling study. *Acta Odontol Scand.* 2013; 71(3-4): 416-23.
11. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974; 82(2): 151-90.
12. 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(3): 243-9.

---

\*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.  
Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

13. Casemiro LA, Martins CHG, Pires-de-Souza FC, Panzeri H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc – part I. *Gerodontology*. 2008; 25(3): 187-94.
14. Cerveira Netto H, Lin D. Condicionadores teciduais. *Rev Fac Odontol São José Campos*. 1977; 6(1): 101-4.
15. Chopde N, Pharande A, Khade MN, Khadtare YR, Shah SS, Apratim A. Source in vitro antifungal activity of two tissue conditioners combined with nystatin, miconazole and fluconazole against *Candida albicans*. *J Contemp Dent Pract*. 2012; 13(5): 695-8.
16. Chow CK, Matear DW, Lawrence HP. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. *Gerodontology*. 1999; 16(2): 110-8.
17. Compagnoni MA, Pero AC, Ramos SM, Marra J, Paleari AG, Rodriguez LS. Antimicrobial activity and surface properties of an acrylic resin containing a biocide polymer. *Gerodontology*. 2012; doi 10.1111/ger.12031: 1-7. Epub 2012 Dec 20.
18. 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(8): 600-5.
19. Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br Dent J*. 1970; 129(4): 151-6.
20. Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Dentino A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. *J Prosthodont*. 2007; 16(6): 465-72.
21. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(8): 1387-92.
22. Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. *Candida*-associated denture stomatitis. *Folia Microbiol*. 2001; 46(5): 443-6.
23. Douglas WH, Walker DM. Nystatin in denture liners-an alternative treatment of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1973; 135(2): 55-9.
24. El- Charkawi H, el-Said EA, Safouh HM, el-Raghi N. Effect of addition antimicrobial agents to denture reliners. *Egypt Dent J*. 1994; 40(3): 785-90.
25. Fotos PG, Vincent SD, Hellstein JW. Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; 74(1): 41-9.
26. Hong S, Leroueil PR, Janus EK, Peters JL, Kober MM, Islam MT, et al. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconj Chem*. 2006; 17(3): 728-34.

27. Hornby JM, Jensen EC, Lisek AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by Farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7): 2982-92.
28. Ignatova M, Voccia S, Gilbert B, Markova N, Cossement D, Gouttebaron R, et al. Combination of electrografting and atom-transfer radical polymerization for making the stainless steel surface antibacterial and protein antiadhesive. *Langmuir.* 2006; 22(1): 255-62.
29. Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y, et al. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the *in vivo* growth of *Candida albicans* and its protective effect an oral Candidiasis model. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(7): 2190-9.
30. Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DMP, Vergani CE. Effect of experimental photopolymerized coating on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *C. albicans* adhesion. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(1): 1-9.
31. 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(4): 352-6.
32. 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(8): 2291-6.
33. Marra J, Paleari AG, Rodriguez LS, Leite AR, Pero AC, Compagnoni MA. Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(6): 643-8.
34. 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(5): 373-7.
35. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho AC, Barbosa DB. Silver distribution and release from na antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont.* 2012; 21(1): 7-15.
36. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, 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(2): 103-10.
37. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, Oliveria R, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses.* 2013; 56(6): 672-80.

38. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, Oliveria R, et al. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol.* 2013; 114(4): 1175-83.
39. Nam KY, Lee CH, Lee CJ. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. *Gerodontology.* 2012; 29(2): 413-9.
40. Nikawa H, Jin C, Makihira S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(3): 243-50.
41. 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(3-4): 139-43.
42. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(5): 350-7.
43. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H. Commercial denture cleansers-cleansing efficacy against *Candida albicans* biofilm and compatibility with soft denture-lining materials. *Int J Prosthodont.* 1995; 8(5): 434-44.
44. Ottersbach P, Kossmann B. Eine neue klasse von bioziden. *GIT Labor Fachzeitschrift.* 2002; 46: 452-6.
45. Ottersbach P, Sosna F, inventor; Creavis Tech & Innovation GmbH, cessionário. Antimicrobial additives. Alemanha DE10022453 A1. 2001May 15.
46. 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.* 2011; 19(3): 195-9.
47. Park SE, Blissett R, Susarla SM, Weber HP. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. *J Prosthodont.* 2008; 17(5): 365-9.
48. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged Poly (methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *J Prosthodont.* 2003; 12(4): 249-54.
49. Pavan S, Santos PH, Arioli Filho JN, Spolidorio DMP. Colonization of soft lining materials by microorganisms. *Gerodontology.* 2010; 27(3): 211-6.
50. Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Costa ACBP, Back-Brito GN, Kaminagakura E, et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76(4): 419-24.

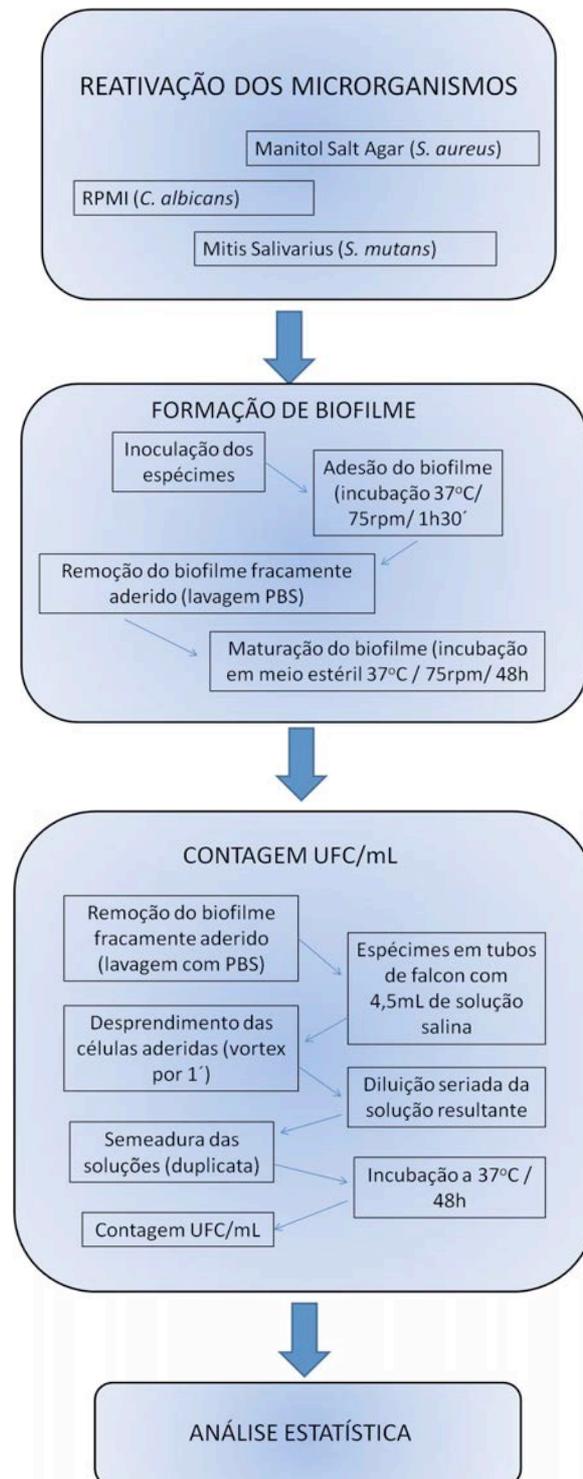
51. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Cury AADB, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(8): 755-64.
52. Pesci-Bardon C, Fosse T, Serre D, Madinier I. *In vitro* antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. *Gerodontology.* 2006; 23(2): 111-6.
53. 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(11): 1115-9.
54. Queiroz JRC, Fissmer SF, Koga-Ito CY, Salvia ACRD, Massi M, Silva-Sobrinho AS, et al. Effect of Diamond-like carbon thin film coated acrylic resin on *Candida albicans* biofilm formation. *J Prosthodont.* 2013; 22(6): 451-5.
55. 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(2): 177-82.
56. Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS. Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of *Candida albicans*. *Gerodontology.* 2010; 27(4): 292-6.
57. 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(1): 53-9.
58. Razek MKA. Influence of tissue – conditioning materials on the oral bacteriologic status of complete denture wearers. *J Prosthet Dent.* 1980; 44(2): 137-42.
59. Regis RR, Vecchia MPD, Pizzolitto AC, Compagnoni MA, Souza PPC, Souza RF. Antimicrobial properties and cytotoxicity of an antimicrobial monomer for application in Prosthodontics. *J Prosthodont.* 2012; 21(4): 283-90.
60. Rodriguez LS, Paleari AG, Giro G, Oliveira Junior NM, Pero AC, Compagnoni MA. Chemical characterization and flexural strength of a denture base acrylic resin with monomer 2 tert-butylaminoethyl methacrylate. *J Prosthodont.* 2012; 22(4): 292-7.
61. 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(4): 311-20.
62. Seyfriedsberger G, Rametsteiner K, Kern W. Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. *Eur Polym J.* 2006; 42(12): 3383-9.
63. Shibata T, Hamada N, Kimoto K, Sawada T, Sawada T, Kumada H, et al. Antifungal effect of acrylic resin containing apatite-coated TiO<sub>2</sub> photocatalyst. *Dent Mater J.* 2007; 26(3): 437-44.

64. Sivakumar I, Arunachalam KS, Sajjan S, Ramaraju AV, Rao B, Kamaraj B. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resin: a research composition and update. *J Prosthodont*. 2013; doi 10.1111. Jopr: 12105: 1-7. Epub 2013 oct 19.
65. Sodagar A, Bahador A, Khalil S, Shahroudi AS, Kassae MZ. The effect of TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles on flexural strength of poly (methyl methacrylate) acrylic resins. *J Prosthodont Res*. 2013; 57(1): 15-9.
66. Sosna F, Ottersbach P, Kossmann B, inventores; Creavis Gesellschaft Fuer Technologie Und Innovation Mbh, Cessionário. Antimicrobial additives. United States US 6790910 B1. 2004 Sept 14.
67. Telles D, Hollweg H, Castellucci L. Prótese total: convencional e sobre implantes. 2 ed. São Paulo: Editora Santos; 2005.
68. Teughels W, Assche NV, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(S2): 68-71.
69. Thein ZN, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(8): 672-80.
70. 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(4): 1171-7.
71. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Magalhães FA, Uzeda M, et al. Clinical aspects of *Candida* species carriage in saliva of xerostomic subjects. *Med Mycol*. 2003; 41(5): 411-5.
72. 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(5): 517-24.
73. Turano JC, Turano LM. Fundamentos de prótese total. 9a ed. São Paulo: Editora Santos; 2010.
74. 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(5): 295-9.
75. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol*. 2012; 112(6): 1163-72.
76. 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(1): 45-50.

*Anexo*

## ANEXO

### Anexo 1 - Fluxograma da metodologia



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

Araraquara, 14 de novembro de 2013

Carina Toda