

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/05/2023.



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



Thaís de Sousa Santana

Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA)

Araraquara

2021



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



Thaís de Sousa Santana

Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero

Araraquara

2021

S232e Santana, Thais de Sousa

Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a metilicina (MSSA) / Thais de Sousa Santana. -- Araraquara, 2021
73 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Ana Carolina Pero

1. Resina acrílica. 2. Nanopartículas. 3. Biofilme. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Thaís de Sousa Santana

Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a metilicina (MSSA)

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero

2º Examinador Prof^a Dr^a Carina Toda

3º Examinador Prof^a Dr^a Janaína Habib Jorge

Araraquara, 27 de Maio de 2021.

Thaís de Sousa Santana

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 27/07/1993 – São Gotardo - MG

Filiação: Paulo Roberto Santana e Selma Sueli Sousa Santana

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2014 – 2018: Curso de Graduação – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr - UNESP)

2019 – 2021: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Curso de Mestrado – FOAr – UNESP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à **Deus**. Minha base, aquele que me sustenta em todos os momentos. Agradeço à Ele por direcionar a minha vida e por ter permitido a realização de tantos objetivos. Ele é tudo em minha vida e minha força para superar todas as dificuldades vem Dele.

Aos meus pais, **Selma e Paulo**. Sou eternamente grata por todo amor, dedicação e paciência comigo. Vocês são minha fonte de sabedoria, força, bons conselhos e, principalmente, meus melhores amigos. Sem vocês nada do que aconteceu seria possível. Vocês são minha inspiração e tudo o que sou devo à vocês! Sou grata pelo apoio e por tudo o que fizeram e fazem por mim.

À minha irmã, **Pollyana**, minha amiga, companheira em todos os momentos, meu exemplo de persistência. Sou grata por todo o apoio e incentivo que tem me dado. Tenho uma imensa gratidão por estar sempre ao meu lado!

Ao meu noivo **Matheus**, gratidão por toda a compreensão, apoio e amor que tem me dado. Você foi e é minha calmaria em meio ao caos. Meu presente de Deus!

À minha querida Orientadora, **Profª Drª Ana Carolina**. Sou grata por tudo o que fez por mim! Por ter me orientado desde o início da Graduação, foram 7 anos de muito aprendizado e não somente profissional, pois o modo de exercer seu dom de ensinar revela também a pessoa maravilhosa que ela é. Sua dedicação e boa vontade em transmitir conhecimento são inspiradoras, Carol!

À **Profª Drª Maria Isabel**, minha gratidão por toda a sua ajuda e disponibilidade em me ensinar! Agradeço por tanta boa vontade e paciência em me guiar no universo da microbiologia. E por ter aceitado me ajudar, mesmo sabendo que eu era totalmente inexperiente. Muito obrigada por tudo, você é uma pessoa sensacional!

A todos os alunos e professores que trabalharam comigo no **Laboratório de Microbiologia**, agradeço a ajuda e companheirismo. Especialmente a **Bruna Pimentel**, que, por muitas vezes, me ensinou com total paciência e boa vontade.

Ao **Grupo de Pesquisa** da Prótese Total, especialmente à **Profª Drª Andressa**, agradeço por toda a ajuda e paciência comigo!

Aos meus queridos amigos **Marlon, Mariana e Su**. A amizade de vocês foi fundamental para que o fardo do Mestrado fosse mais leve de carregar. Minha gratidão por compartilharem tantos momentos juntos. Vocês são presentes que a FOAr me deu e que eu vou levar para a vida toda.

Agradeço também a **todos os funcionários** dessa Faculdade, cada um de vocês foi muito importante para meu crescimento intelectual e pessoal durante esses anos. Gratidão aos nossos Diretores Prof. Dr. **Edinho** e Profª Drª **Patrícia** por cuidarem de nossa Faculdade com tanto amor e dedicação. Aos Professores, agradeço por desempenharem com dedicação as aulas ministradas, sendo elas fundamentais para minha formação. Aos Técnicos, Secretárias, Bibliotecárias, Funcionários da segurança, da limpeza, e aos demais funcionários, meus sinceros agradecimentos.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/07491-6) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Santana TS. Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

A utilização de biopolímeros de fontes renováveis como agentes de reforço nanométricos pode representar uma importante inovação em materiais odontológicos. O objetivo desse estudo foi avaliar a adesão e formação de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e a viabilidade dos micro-organismos na superfície de uma resina acrílica para base de prótese, após a incorporação de nanocristais de celulose (NC). Nanocristais de celulose (NC) isolados a partir de polpa de madeira (*Eucalyptus Urograndis*) foram incorporados em uma resina acrílica para base de prótese (Onda-Cryl® - OC, ativada por energia de micro-ondas). Discos de resina acrílica (15 x 3 mm) foram obtidos (N=240) em cada condição experimental (grupos 0%NC - controle e 0,75%NC). Previamente aos testes de adesão e formação de biofilmes, foi mensurada a rugosidade média da superfície dos discos (n=120) em rugosímetro digital (Ra, µm) e a energia livre de superfície (ELS) a partir de medidas de ângulo de contato (n=120), obtidas por meio de um goniômetro conectado a um sistema computadorizado. Foi realizada a formação de biofilmes a partir dos inóculos de *C. albicans* e *S. aureus* sobre os discos de resina, os quais foram incubados a 37°C por 90 minutos e 48h. Após ambos os períodos, foram feitas as análises de: metabolismo celular pelo ensaio do XTT (n=9); avaliação da atividade antimicrobiana através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) (n=9) e análise por microscopia confocal a laser (n=2). Todas as análises foram realizadas em triplicata em 3 ocasiões distintas. Os dados foram tabulados e submetidos aos testes T de Student e teste não paramétrico U de Mann-Withney, de acordo com a aderência à normalidade, e foi empregado um nível de significância de 5%. A incorporação de NC (0,75%) não exerceu influência sobre os resultados de rugosidade e ELS para a resina OC (P>0,05). Também foi observado, (método XTT e log UFC/mL), que não houve diferença significativa entre os grupos para a adesão e formação de biofilme dos diferentes micro-organismos analisados. A microscopia confocal mostrou marcações que evidenciam a viabilidade dos micro-organismos e estas foram semelhantes para ambos os grupos (Controle e NC 0,75%). Dessa forma, conclui-se que a incorporação de 0,75% de NC não exerceu influência sobre as propriedades físicas (rugosidade e energia livre de superfície) e microbiológicas (adesão e formação de biofilme/microscopia confocal) da resina acrílica para base protética.

Palavras-chave: Resina acrílica. Nanopartículas. Biofilme.

Santana TS. Effect of incorporation of cellulose nanocrystals in a denture base resin on superficial properties and simple and mixed *Candida albicans* and Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) biofilms [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

The use of biopolymers from renewable sources as nanometric reinforcing agents can represent an important innovation in dental materials. The aim of this study was evaluate the simple and mixed biofilm formation of *Candida albicans* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and microorganisms' viability on the surface of acrylic resin for denture base, after the incorporation of cellulose nanocrystals (CN). Cellulose nanocrystals (NC) isolated from wood pulp (*Eucalyptus Urograndis*) were incorporated into acrylic resin for denture base (Onda-Cryl® - OC, activated by microwave energy). Disc-shaped specimens (15 x 3 mm) were obtained (N=240) for each condition (groups 0%CN - control, and 0.75%CN) Prior to the adhesion and biofilm formation tests, the surface roughness was measured (n=120) in a digital rugosimeter (Ra, μm) and the surface free energy (SFE) was measured from contact angle measurements (n=120), obtained by means of a goniometer connected to a computerized system. The formation of biofilms was performed from the inoculation of *C. albicans* and *S. aureus* on the acrylic resin discs, which were incubated at 37°C for 90 minutes and 48h. After both periods, the analysis of cell metabolism test (XTT) was performed (n=9); evaluation of antimicrobial activity by counting colony-forming units (CFU/ml) (n=9) and analysis by confocal laser microscopy (n=2). All analyses were performed in triplicate on 3 distinct occasions. Data were tabulated and submitted to Student t test and non-parametric Mann-Whitney U test, according to adherence to normality, at 5% of significance level. The incorporation of NCs (0.75%) did not influence the results of the surface roughness and surface free energy (SFE) tests for OC acrylic resin ($P>0.05$). It was also observed, (XTT method and CFU/mL log), that there was no significant difference between the groups for the adhesion and formation of biofilm of the different microorganisms analyzed. The confocal laser microscopy exhibited images that show the viability of the microorganisms and these were similar for both groups (control and NC 0.75%). Thus, it could be concluded that the incorporation of 0.75% of NC did not influence the physical (roughness and free surface energy) and microbiological (adhesion and biofilm formation/confocal microscopy) properties of the acrylic resin for denture base.

Keywords: Acrylic resin. Nanoparticles. Biofilm.

LISTA DE ABREVIações

- NC: Nanocristais de celulose
- OC: Onda-Cryl
- ELS: Energia Livre de superfície
- UFC: Unidades formadoras de colônias
- GPa: Gigapascal
- PMMA: Polimetilmetacrilato
- MMA: Metilmetacrilato
- Fapesp: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- EP: estomatite protética
- PPR: Próteses parciais removíveis
- CHX: Clorexidina
- CIM: concentração inibitória mínima
- CBMs: concentrações bactericidas mínimas
- CFM: concentração fungicida mínima
- FICI: Índice de concentração inibitória fracionada
- MET: microscópio eletrônico de transmissão
- MEV: microscópio eletrônico de varredura
- FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformador de Fourier
- FV: fibra de vidro
- RAA: resina acrílica autopolimerizável
- RAC: resina acrílica de polimerização térmica convencional
- RAR: resina acrílica de polimerização térmica de alta resistência
- RF-LP: resistência à flexão no limite proporcional
- FVC: fibra de vidro unidirecional contínua
- Nps: Nanopartículas
- AgNPs: nanopartículas de prata
- nano-ZrO₂: nanopartículas de óxido de zircônio
- NFC: nanofibra de celulose
- CMC: celulose microcristalina
- CIVMR: cimentos de ionômero de vidro modificados por resina
- NCB: nanocristais de celulose bacteriana
- SDA: Sabouraud Dextrose

- BHI: Brain heart infusion
- TYE: Tryptone and Yeast Extract
- DO: densidade ótica
- UV: Ultravioleta
- PBS: Phosphate Buffered saline
- PI: Iodeto de propídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Considerações Sobre o Uso de Próteses – Material de Confeção e Implicações Clínicas.....	14
2.2 Incorporação de Agentes de Reforço em Resinas PMMA.....	20
3 PROPOSIÇÃO	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Material	32
4.2 Método	32
4.2.1 Obtenção dos nanocristais de celulose (NC).....	33
4.2.2 Trocas de solventes.....	33
4.2.3 Grupos experimentais.....	33
4.2.4 Confeção dos corpos de prova.....	34
4.2.5 Avaliação da rugosidade.....	36
4.2.6 Avaliação da energia livre de superfície.....	36
4.2.7 Avaliação da adesão e formação de biofilmes na resina acrílica após a incorporação dos NC.....	37
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Rugosidade.....	43
5.2 Energia Livre de Superfície (ELS).....	44
5.3 Adesão do Biofilme Multiespécies.....	44
5.4 Formação do Biofilme Multiespécies.....	46
5.5 Análise por Microscopia Confocal.....	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE.....	64
ANEXO.....	68

1 INTRODUÇÃO

O grande interesse em materiais sustentáveis e ambientalmente corretos tem incentivado às pesquisas acadêmicas e industriais a desenvolver biopolímeros para aplicações alternativas às quais polímeros oriundos de fontes fósseis são tradicionalmente empregados¹. Para este fim, muitos biopolímeros têm sido modificados visando uma adequação em termos de propriedades desejadas.

Os nanocristais de celulose (NC) são materiais com características únicas derivados da celulose, a qual é o biopolímero mais abundante na Terra, biodegradável oriundo de fontes renováveis vegetais e animais². Esses materiais têm recebido significativo interesse devido às suas propriedades mecânicas, óticas, químicas e reológicas, tais como elevada área superficial, elevado módulo de elasticidade (aproximadamente 150 GPa), habilidade de atuar como reforço significativo empregando baixos níveis de carga, baixa densidade, natureza não abrasiva, além de biocompatibilidade¹⁻¹¹ e propriedades antimicrobianas^{12,13}.

Os NC são partículas de celulose em formato de agulha, com dimensão equivalente ou inferior a 100 nm, de natureza altamente cristalina⁸. Os NC são obtidos a partir da hidrólise ácida das fibras de celulose que são biodegradáveis e de natureza renovável, com caráter hidrofílico. Há registros¹⁴ na literatura consultada sobre a incorporação de NC em matriz de Polimetilmetacrilato (PMMA), com o objetivo de reforçar essa matriz para aplicação em dispositivos óticos, devido às excelentes propriedades de transparência e baixa densidade deste polímero. No estudo de Liu et al.¹⁴ (2010), a incorporação de NC ao PMMA produziu compósitos com boa transparência e com melhores propriedades mecânicas em relação à matriz de PMMA puro.

Estudos para avaliação do desempenho da incorporação de NC em matrizes poliméricas, especificamente resinas acrílicas para uso odontológico, podem representar uma importante inovação para os materiais odontológicos. Estudos têm demonstrado melhora nas propriedades de resinas compostas e cimentos de ionômero de vidro após incorporação de NC¹⁵⁻¹⁸. Entretanto, a avaliação do efeito da incorporação de NC em resinas acrílicas à base de PMMA ainda é limitada. Até o momento, poucos estudos demonstraram¹⁹ que o uso de NC para reforço de uma

resina para base protética (PMMA) para impressão 3D tem potencial para futuras aplicações clínicas.

A base protética de resina acrílica é considerada um ambiente propício para proliferação e sobrevivência de micro-organismos bucais e formação de biofilme microbiano²¹, devido à facilidade de células microbianas se aderirem às rugosidades e poros superficiais presentes nessa base protética. O crescimento microbiano na superfície protética ocorre a partir da adesão de espécies de micro-organismos, às superfícies, como prótese e mucosa oral, induzindo a uma resposta inflamatória crônica na mucosa bucal, denominada estomatite protética²²⁻²⁵.

A estomatite protética, caracterizada pela presença de área eritematosa na mucosa que mantém contato com a prótese, é considerada a lesão bucal mais comumente observada e afeta de 24-60% dos usuários de próteses removíveis, totais ou parciais²³⁻²⁴. Estudos prévios concluíram que os micro-organismos *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* são os mais prevalentes tanto na mucosa como na parte interna das próteses de pacientes²⁶⁻²⁸.

Esses micro-organismos têm a capacidade de se aglutinar em estruturas complexas, formando biofilmes mistos, caracterizados por diversas formas celulares microbianas aderidas em um substrato, e envoltas por uma matriz de polímeros extracelulares²⁹⁻³¹.

A *C.albicans*, um fungo comensal, é a espécie mais prevalente nas candidoses bucais³². Um dos fatores que pode ser atribuído à sua virulência é a capacidade de interagir com outros micro-organismos no meio bucal³³. O micro-organismo *S.aureus*, uma bactéria gram-positiva também bastante prevalente nas candidoses bucais, tem especial relevância devido à sua elevada virulência e capacidade de desenvolver resistência às terapias medicamentosas³⁴. De acordo com estudos prévios, a interação de *C.albicans* e *S.aureus* em infecções polimicrobianas aumenta a severidade das doenças³⁵, como a estomatite protética³⁶, além de aumentar o risco de desenvolvimento de infecções sistêmicas, de difícil tratamento³⁷.

Embora não sejam totalmente conhecidos, os mecanismos de adesão de micro-organismos à superfície da prótese estão relacionados com as propriedades dessa superfície, como rugosidade e interações eletrostáticas representadas por forças hidrofóbicas^{28,38-40}. Estudos prévios observaram que a retenção de micro-organismos ocorre mais rapidamente em superfícies rugosas por apresentarem maior área de contato e também por dificultarem a ação mecânica de limpeza^{21,41}. Em

relação à hidrofobicidade, alguns estudos demonstraram que quanto mais hidrofóbica a superfície, maior a adesão de *Candida* spp. por unidade de área^{40,42}, enquanto em outro estudo²⁸ foi demonstrado que a diminuição do ângulo de contato implicou no aumento de adesão de *C.albicans* e, por outro lado, reduziu a adesão de *Candida tropicalis*.

O estudo da incorporação de NC em resinas acrílicas para base protética e para reembasamento têm sido realizados com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) em vigência (Auxílio à Pesquisa Regular 2017/26512-9) por nosso grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a. Dra. Ana Carolina Pero. Os resultados até o momento obtidos demonstraram que a incorporação de NC nas concentrações de 0,75% e 1% na resina acrílica Onda-Cryl®, ativada por meio de micro-ondas, produziu um significativo aumento na dureza superficial desta resina, reduziu a resistência à flexão, porém dentro do limite aceito (65 MPa) e não foi capaz de alterar a cor em níveis considerados clinicamente inaceitáveis. Para complementação desses estudos, considerou-se oportuno avaliar o efeito da incorporação de NC nesta resina sobre outras propriedades de superfície e a formação de biofilmes.

A hipótese do nosso projeto é que a incorporação de NC em uma resina acrílica de uso odontológico modificaria suas propriedades superficiais tais como a sua energia livre de superfície e rugosidade, possivelmente influenciando na adesão e formação de biofilme sobre esse material.

A hipótese nula testada no presente estudo foi que a adesão e formação de biofilme e a viabilidade dos micro-organismos sobre a superfície da resina acrílica não seriam afetadas pela incorporação de NC. Caso esta hipótese seja rejeitada, o presente estudo tem potencial para apresentar como alternativa o desenvolvimento de resinas acrílicas para base protética reforçadas a partir de biomassa residual vegetal, com propriedades de superfície capazes de reduzir a formação de biofilme em próteses odontológicas e, conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento de patologias bucais em usuários de próteses. Assim, o projeto apresenta característica tecnológica, econômica e ambiental, além de poder gerar benefícios diretamente aos usuários de próteses totais ou parciais.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a incorporação de 0,75% de NC na resina acrílica para base protética polimerizada por micro-ondas (Onda-Cryl®) não exerceu influência sobre suas propriedades físicas (rugosidade e energia livre de superfície) e microbiológicas (adesão e formação de biofilme).

REFERÊNCIAS*

- 1- Silvério HA, Flauzino Neto WP, Pasquini D. Effect of incorporating cellulose nanocrystals from corncob on the tensile, thermal and barrier properties of Poly (Vinyl Alcohol) nanocomposites. J Nanomater. 2013; 2013: 1-9.
- 2- Alternativas de uma fibra vegetal. Rev Pesq Fapesp. 2017 [acesso 2019 mar 2]; 253: 70-3. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2017/03/17/alternativas-de-uma-fibra-vegetal/>.
- 3- Peng BL, Dhar N, Liu HL, Tam KC. Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: a nanotechnology perspective. Can J Chem Eng. 2011; 89: 1191-206.
- 4- Habibi Y, Dufresne A. Highly filled bionanocomposites from functionalized polysaccharide nanocrystals. Biomacromolecules. 2008; 9: 1974-80.
- 5- Jean B, Dubreuil F, Heux L, Cousin F. Structural details of cellulose nanocrystals/Polyelectrolytes multilayers probed by neutron reflectivity and AFM. Langmuir. 2008; 24: 3452-8.
- 6- Flauzino Neto WP, Silvério HA, Vieira JG, Alves HCS, Pasquini D, Assunção RMN, et al. Preparation and characterization of nanocomposites of carboxymethyl cellulose reinforced with cellulose nanocrystals. Macromol. Symp. 2012; 319: 93-8.
- 7- Silvério HA, Flauzino Neto WP, Dantas NO, Pasquini D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. Ind Crops Prod. 2013; 44: 427-36.
- 8- Flauzino Neto WP, Silvério HA, Dantas NO, Pasquini D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue Soy hulls. Ind Crops Prod. 2013; 42: 480-8.
- 9- Silvério HA, Flauzino Neto WP, da Silva ISV, Rosa JR, Pasquini D, Assunção RMN, et al. Mechanical, thermal, and barrier properties of methylcellulose/cellulose nanocrystals nanocomposites. Polímeros. 2014; 24: 683-8.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- 10-** Flauzino Neto WP, Mariano M, da Silva ISV, Silvério HA, Putaux J, Otaguro H, et al. Mechanical properties of natural rubber nanocomposites reinforced with high aspect ratio cellulose nanocrystals isolated from soy hulls. *Carbohydr Polym.* 2016; 153: 143-52.
- 11-** Flauzino Neto WP, Putaux J, Mariano M, Ogawa Y, Otaguro H, Pasquini D, et al. Comprehensive morphological and structural investigation of cellulose I and II nanocrystals prepared by sulphuric acid hydrolysis. *RSC Adv.* 2016; 79: 76017-27.
- 12-** de Castro DO, Bras J, Gandini A, Belgacem N. Surface grafting of cellulose nanocrystals with natural antimicrobial rosin mixture using a green process. *Carbohydr Polym.* 2016; 137: 1-8.
- 13-** Fortunati E, Rinaldi S, Peltzer M, Bloise N, Visai L, Armentano I, et al. Nanobiocomposite films with modified cellulose nanocrystals and synthesized silver nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2014; 101: 1122–33.
- 14-** Liu H, Liu D, Yao F, Wu Q. Fabrication and properties of transparent polymethylmethacrylate/cellulose nanocrystals composites. *Bioresour Technol.* 2010; 101: 5685-92.
- 15-** Wang Y, Hua H, Li W, Wang R, Jiang X, Zhu M. Strong antibacterial dental resin composites containing cellulose nanocrystal/zinc oxide nanohybrids *J Dent.* 2019; 80: 23-9.
- 16-** Moradian M, Nosrat Abadi M, Jafarpour D, Saadat M. Effects of bacterial cellulose nanocrystals on the mechanical properties of resin-modified glass ionomer cements. *Eur J Dent.* 2021; 15(02): 197-201.
- 17-** Peres BU, Manso AP, Carvalho LD, Ko F, Troczynski T, Vidotti HA, Carvalho RM. Experimental composites of polyacrylonitrile-electrospun nanofibers containing nanocrystal cellulose. *Dent Mater.* 2019; 35: e286-e97.
- 18-** Menezes-Silva R, de Oliveira BMB, Fernandes PHM, Shimohara LY, Pereira FV, Borges AFS, Buzalaf MAR, Pascotto RC, Sidhu SK, de Lima Navarro MF. Effects of the reinforced cellulose nanocrystals on glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2019; 35: 564-573.
- 19-** Chen S, Yang J, Jia YG, Lu B, Ren L. A study of 3D-Printable reinforced composite resin: PMMA modified with silver nanoparticles loaded cellulose nanocrystal. *Materials (Basel).* 2018; 11: 2444.

- 20- Jaiswal P, Pande N, Banerjee R, Radke U. Effect of repeated microwave disinfection on the surface hardness of a heat-cured denture base resin: an in vitro study. *Contemp Clin Dent*. 2018; 9: 446-51.
- 21- Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent*. 1998; 26: 577-83.
- 22- Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10: 99-116.
- 23- Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987; 14: 217-27.
- 24- Moskona D, Kaplan I. Oral lesions in elderly denture wearers. *Clin Prev Dent*. 1992; 14: 11-4.
- 25- Nair RG, Samaranayake LP. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An in vitro study. *APMIS*. 1996; 104: 339–49.
- 26- Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10: 27-39.
- 27- Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Spolidorio DMP, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. *J Dent*. 2009; 37: 666-72.
- 28- O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS One*. 2015; 10: e0137717.
- 29- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80: 903-8.
- 30- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003; 11: 30-6.
- 31- Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 109-18.
- 32- Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78: 455-9.

- 33-** Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch Oral Biol*. 2013; 58: 1318-26.
- 34-** Chadwick PR. Revised UK guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 1999; 11: 89-91.
- 35-** Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1000886.
- 36-** Nair N, Biswas R, Götz F, Biswas L. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infect Immun*. 2014; 82: 2162-9.
- 37-** Li H, Zhang C, Liu P, Liu W, Gao Y, Sun S. In vitro interactions between fluconazole and minocycline against mixed cultures of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015; 48: 655-61.
- 38-** Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suganaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun*. 1985; 47: 11-4.
- 39-** Horbett TA, Waldburger JJ, Ratner BD, et al. Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus. *J Biomed Mater Res*. 1988; 22: 383-404.
- 40-** de Foggi CC, Machado AL, Zamperini CA, Fernandes D, Wady AF, Vergani CE. Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. *J Investig Clin Dent*. 2016; 7: 141-8.
- 41-** Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun*. 1985; 50: 97-101.
- 42-** Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent*. 1997; 77: 535-9.
- 43-** Zarb GA, Hobkirk J, Eckert S, Jacob R. Tratamento protético para pacientes edêntulos. 13.ed. St. Louis: Mosby/Elsevier; 2012. p. 1-27.
- 44-** Peyton FA. History of resins in dentistry. *Dent Clin North Am*. 1975; 19(2): 211-22.
- 45-** Meng TR, Latta MA. Physical properties of four acrylic denture base resins. *J Contemp Dent Pract*. 2005; 6: 93–100.
- 46-** Alla R, Raghavendra KN, Vyas R, Konakanchi A. Conventional and contemporary polymers for the fabrication of denture prosthesis: part I – overview, composition and properties. *Int J Appl Dent Sci*. 2015; 1: 82–9.

- 47- Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1995; 74: 309-13.
- 48- Papadiochou S, Polyzois G. Hygiene practices in removable prosthodontics: A systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2018; 16: 179-201.
- 49- Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98: 53-9.
- 50- Aoun G, Berberi A. Prevalence of chronic erythematous candidiasis in lebanese denture wearers: a clinico-microbiological study. *Mater Sociomed*. 2017; 29: 26-9.
- 51- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 167-93.
- 52- Emami E, Taraf H, de Grandmont P, Gauthier G, de Koninck L, Lamarche C, et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2012; 25: 113-9.
- 53- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16: e139-43.
- 54- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001; 183: 5385-94.
- 55- Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10: E27-39.
- 56- Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Pereira Costa AC, Back-Brito GN, Kaminagakura E, et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76: 419-24.
- 57- Kean R, Rajendran R, Haggarty J, Townsend EM, Short B, Burgess KE, et al. *Candida albicans* mycofilms support *Staphylococcus aureus* colonization and enhances miconazole resistance in dual-species interactions. *Front Microbiol*. 2017; 8: 258.

- 58- Todd OA, Peters BM. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* pathogenicity and polymicrobial interactions: lessons beyond Koch's postulates. *J Fungi* (Basel). 2019; 5: 81.
- 59- Zainal M, Mohamad Zain N, Mohd Amin I, Ahmad VN. The antimicrobial and antibiofilm properties of allicin against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* - A therapeutic potential for denture stomatitis. *Saudi Dent J*. 2021; 33: 105-11.
- 60- Meng TR, Latta MA. Physical properties of four acrylic denture base resins. *J Contemp Dent Pract*. 2005; 6: 93–100.
- 61- Alla R, Raghavendra KN, Vyas R, Konakanchi A. Conventional and contemporary polymers for the fabrication of denture prosthesis: part I – overview, composition and properties. *Int J Appl Dent Sci*. 2015; 1: 82–9.
- 62- Xu J, Li Y, Yu T, Cong L. Reinforcement of denture base resin with short vegetable fiber. *Dent Mater*. 2013; 29: 1273-9.
- 63- Yu W, Wang X, Tang Q, Guo M, Zhao J. Reinforcement of denture base PMMA with ZrO(2) nanotubes. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014; 32: 192-7.
- 64- Wang W, Liao S, Zhu Y, Liu M, Zhao Q, Fu Y. Recent applications of nanomaterials in prosthodontics. *J Nanomater*. 2015; 2015: 1-11.
- 65- Murthy HB, Shaik S, Sachdeva H, Khare S, Haralur SB, Roopa KT. Effect of reinforcement using stainless steel mesh, glass fibers, and polyethylene on the impact strength of heat cure denture base resin - an in vitro study. *J Int Oral Health*. 2015; 7: 71-9.
- 66- Yoshida K, Takahashi Y, Hamanaka I, Kawaguchi T, Sasaki H, Shimizu H. Reinforcing effect of glass fiber-reinforced composite reinforcement on flexural strength at proportional limit of a repaired denture base resin. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2015; 1: 81-5.
- 67- Yoshida K, Takahashi Y, Sasaki H, Hamanaka I, Kawaguchi T. Flexural strengths of reinforced denture base resins subjected to long-term water immersion. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2016; 2: 20-4.
- 68- Gad M, ArRejaie AS, Abdel-Halim MS, Rahoma A. The reinforcement effect of nano-zirconia on the transverse strength of repaired acrylic denture base. *Int J Dent*. 2016; 2016: 7094056.

- 69- Dhole RI, Srivatsa G, Shetty R, Huddar D, Sankeshwari B, Chopade S. Reinforcement of aluminum oxide filler on the flexural strength of different types of denture base resins: an in vitro study. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11: ZC101-4.
- 70- Gad MM, Fouda SM, Al-Harbi FA, Näpänkangas R, Raustia A. PMMA denture base material enhancement: a review of fiber, filler, and nanofiller addition. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12: 3801-12.
- 71- Sasaki H, Hamanaka I, Takahashi Y, Kawaguchi T. Effect of reinforcement on the flexural properties of injection-molded thermoplastic denture base resins. *J Prosthodont.* 2017; 26: 302-8.
- 72- Naji SA, Kashi TSJ, Behroozibakhsh M, Hajizamani H, Habibzadeh S. Recent advances and future perspectives for reinforcement of poly(methyl methacrylate) denture base materials: a literature review. *J Dent Biomater.* 2018; 5: 490–502.
- 73- Chen S, Yang J, Jia YG, Lu B, Ren L. A study of 3D-Printable reinforced composite resin: PMMA modified with silver nanoparticles loaded cellulose nanocrystal. *Materials (Basel).* 2018; 11: 2444.
- 74- Wang Y, Hua H, Li W, Wang R, Jiang X, Zhu M. Strong antibacterial dental resin composites containing cellulose nanocrystal/zinc oxide nanohybrids. *J Dent.* 2019; 80: 23-9.
- 75- Gad MM, Al-Thobity AM, Rahoma A, Abualsaud R, Al-Harbi FA, Akhtar S. Reinforcement of PMMA denture base material with a mixture of ZrO₂ nanoparticles and glass fibers. *Int J Dent.* 2019; 2019: 2489393.
- 76- Karci M, Demir N, Yazman S. Evaluation of flexural strength of different denture base materials reinforced with different nanoparticles. *J Prosthodont.* 2019; 28: 572-9.
- 77- Wang J, Liu X, Jin T, He H, Liu L. Preparation of nanocellulose and its potential in reinforced composites: a review. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019; 30: 919-46.
- 78- Al-Thobity AM. The impact of polymerization technique and glass-fiber reinforcement on the flexural properties of denture base resin material. *Eur J Dent.* 2020; 14: 92-9.
- 79- Kawaguchi T, Lassila LVJ, Baba H, Tashiro S, Hamanaka I, Takahashi Y, et al. Effect of cellulose nanofiber content on flexural properties of a model, thermoplastic, injection-molded, polymethyl methacrylate denture base material. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020; 102: 103513.

- 80-** Rahaman Ali AAA, John J, Mani SA, El-Seedi HR. Effect of thermal cycling on flexural properties of microcrystalline cellulose-reinforced denture base acrylic resins. *J Prosthodont.* 2020; 29: 611-6.
- 81-** Moradian M, Nosrat Abadi M, Jafarpour D, Saadat M. Effects of bacterial cellulose nanocrystals on the mechanical properties of resin-modified glass ionomer cements. *Eur J Dent.* 2021; 15(2): 197-201.
- 82-** Bangera MK, Kotian R, N R. Effect of titanium dioxide nanoparticle reinforcement on flexural strength of denture base resin: a systematic review and meta-analysis. *Jpn Dent Sci Rev.* 2020; 56: 68-76.
- 83-** Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13: 136-40.
- 84-** International Organization for Standardization. ISO 1567: denture base polymers. 2nd ed. Geneve: ISO; 1998.
- 85-** Janssen D, De Palma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. *Thin Solid Films.* 2006; 515: 1433–8.
- 86-** 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.* 2014; 31: 220-6.
- 87-** Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of time of storage in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int.* 2009; 40: 93-100.
- 88-** Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc.* 2008; 3: 1909-24.
- 89-** Flauzino Neto WP, Silvério HA, Dantas NO, Pasquini D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue-soy hulls *Ind Crops Prod.* 2013; 42: 480-8.
- 90-** Emmanouil JK, Kavouras P, Kehagias T. The effect of photo-activated glazes on the microhardness of acrylic baseplate resins. *J Dent.* 2002; 30: 7-10.
- 91-** Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997; 13: 258-69.

- 92-** da Silva WJ, Leal CM, Viu FC, Gonçalves LM, Barbosa CM, Del Bel Cury AA. Influence of surface free energy of denture base and liner materials on *Candida albicans* biofilms. *J Investig Clin Dent*. 2015; 6: 141-6.
- 93-** Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol*. 2010; 55: 763-70.
- 94-** Nikawa H, Jin C, Makihiro 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: 243-50.
- 95-** Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent*. 2001; 29: 197-204.
- 96-** Combe EC, Owen BA, Hodges JS. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. *Dent Mater*. 2004; 20: 262-8.
- 97-** Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suganaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun*. 1985; 47: 11-4.
- 98-** Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10: 99-116.
- 99-** Koch C, Bürgers R, Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology*. 2013; 30: 309-13.
- 100-** Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007; 20: 308-10.
- 101-** Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Río-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont*. 2005; 18: 392-8.

- 102-** da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94: 149-56.
- 103-** Al-Harbi FA, Abdel-Halim MS, Gad MM, Fouda SM, Baba NZ, AlRumaih HS, et al. Effect of nanodiamond addition on flexural strength, impact strength, and surface roughness of pmma denture base. *J Prosthodont*. 2019; 28: e417-25.
- 104-** Botega DM, de Souza Machado T, de Mello JA, Garcia RC, Del Bel Cury AA. Polymerization time for a microwave-cured acrylic resin with multiple flasks. *Braz Oral Res*. 2004; 18: 23-8.
- 105-** 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: 195-9.
- 106-** Tyagi P, Mathew R, Opperman C, Jameel H, Gonzalez R, Lucia L, et al. High-strength antibacterial chitosan-cellulose nanocrystal composite tissue paper. *Langmuir*. 2019; 35: 104112.
- 107-** Silvério HA, Leite ARP, da Silva MDD, de Assunção RMN, Pero AC, Pasquini D. Poly (ethyl methacrylate) composites reinforced with modified and unmodified cellulose nanocrystals and its application as a denture resin. *Polymer Bull*. 2021. doi: 10.10071/s00289-021-03621-0