



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



Camilla Olga Tasso

**Influência de substâncias antimicrobianas sobre biofilmes simples e misto
formados em resinas acrílicas para base e reembasamento de prótese**

Araraquara

2023



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



Camilla Olga Tasso

**Influência de substâncias antimicrobianas sobre biofilmes simples e misto
formados em resinas acrílicas para base e reembasamento de prótese**

Tese apresentada ao programa de Odontologia,
área de Reabilitação Oral da Universidade
Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de
Odontologia de Araraquara, para a obtenção do
título de Doutor em Odontologia, área de
Reabilitação Oral.

Orientadora: Janaina Habib Jorge

Araraquara

2023

T214i Tasso, Camilla Olga
Influência de substâncias antimicrobianas sobre biofilmes simples e misto formados em resinas acrílicas para base e reembasamento de prótese / Camilla Olga Tasso. -- Araraquara, 2023
89 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Janaina Habib Jorge

1. Biofilmes. 2. Estomatite sob prótese. 3. Resinas acrílicas. 4. Candida albicans. 5. Streptococcus mutans. 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.

Camilla Olga Tasso

Influência de substâncias antimicrobianas sobre biofilmes simples e misto formados em resinas acrílicas para base e reembasamento de prótese

Comissão Julgadora

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, Área de Prótese.

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

2º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

3º Examinador: Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia

4º Examinador: Prof. Dr. Maurício Malheiros Badaró

5º Examinador: Profa. Dra. Ana Carolina Pero

Araraquara, 7 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES

CAMILLA OLGA TASSO

NASCIMENTO: 06/02/1991 – São Carlos – São Paulo

FILIAÇÃO: Luis Carlos Tasso
Luzia Pereira Candido Tasso

2011 a 2016 Graduação em Odontologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2012 a 2013 Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Dentística, do Departamento de Odontologia Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2013 a 2014 Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Periodontia, do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2014 a 2015 Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Removível, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2015 a 2016 Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Removível, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2017 a 2019 Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2017 a 2018 Estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2019 a 2023 Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2021 a 2022 Estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2022 a 2023 Estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho à Deus por seu olhar generoso sobre a minha vida, sempre me guardando, me guiando e amparando em todos os meus momentos, sejam eles de aflições ou alegrias.

Agradeço por todas as pessoas queridas que me acompanham nesse caminho, segurando em minha mão, e que de alguma forma tornaram possível a realização deste sonho. Principalmente aos meus pais Luis e Luzia, pelo apoio imensurável, confiança e amor que depositam em mim, vocês são minha motivação de vida, e força para lutar pelos meus objetivos, são a verdadeira fonte do meu amor eterno.

Ao meu irmão Pedro, que está ao meu lado por toda a minha vida, alegria dos meus dias, mesmo sendo o mais novo, me ajuda a encontrar quase todas as respostas e caminhos. Ao meu namorado Gabriel por ser tão cuidadoso, amoroso, por toda a paciência em me ajudar a ser uma pessoa melhor, você é um exemplo de amor e dedicação por onde passa, você é luz na minha vida!

Amo muito cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom de minha vida, pelas inúmeras vezes que me amparou, me iluminou e me fez encontrar meu verdadeiro caminho quando parecia que não havia luz. Minha vida é, e sempre será dedicada ao Senhor.

Aos meus pais Luis e Luzia por serem pessoas incríveis, bondosas, generosas, e que apesar de todas as dificuldades sempre lutaram pelo nosso futuro, por nos dar ótimos exemplos, tanto pessoais como profissionais. Eu sempre vou buscar ser justa, honesta, humilde, pois meus passos são guiados por vocês. Tudo que eu faço dedico a nossa família.

Ao meu irmão Pedro por ter se tornado uma pessoa tão admirável, dedicado e amoroso. Você é brilhante e eu morro de orgulho de ser sua irmã, que sua inteligência e carisma te faça conquistar o mundo.

Ao meu namorado Gabriel por todos esses anos ao meu lado, sempre me apoiando, me ajudando, e preenchendo os meus dias de amor e carinho. Minha vida sem você com certeza seria vazia.

Aos meus familiares que são tão presentes, que vibram a cada conquista, que param o mundo para lutarem por mim, meus sinceros agradecimentos por vocês significarem tanto. Agradeço a todos que já são estrelinhas no céu, pois sempre me amaram incondicionalmente, e torceram tanto por minhas conquistas!

A minha avó Maria (in memoriam) que esteve sempre presente em minha vida, e eu na dela. Sei o quanto você sempre se orgulhava de mim, e eu de você, por ter sido uma mulher forte, guerreira e determinada. Sempre vou me lembrar da senhora, e sinto você viva nos meus dias.

Agradeço principalmente à minha querida orientadora, Janaina Habib Jorge, por simplesmente ter se tornado mais que uma professora em minha vida. Não só pra mim, mas pra todos os seus agregados. Você é uma pessoa de luz que transfere amor

em tudo que faz. Eu admiro sua força, dedicação, honestidade e resiliência em ser o que é. Obrigada por sempre acreditar em meu potencial, por toda a paciência e zelo que sempre teve comigo ao longo desses anos. A minha trajetória acadêmica foi muito importante, e muito especial pois sempre estive ao meu lado. Espero que o encerramento desse ciclo seja apenas mais uma etapa na nossa parceria. Que nosso caminho continue entrelaçado e que a nossa amizade perdure pelo tempo. Obrigada por todo o aprendizado! Amo você.

Agradeço as minhas amigas de infância, Renata, Érica, Marcela, Sthefany e Taína que estão em meu coração por toda a minha vida, fazendo dos meus dias mais leves. Amo vocês!

Agradeço a todas as minhas queridas “migas” que a graduação me deu, Alice, Giovanna, Jaqueline, minha eterna duplinha Débora, foram tantos momentos e histórias que vivemos juntas, tenho certeza nossa amizade vai muito além da faculdade. Obrigada por tudo meninas!

Não posso deixar de agradecer as pessoas maravilhosas que a pós-graduação me presenteou. Marlon, Jhonny, Amanda, Jacqueline, Maria Isabel. Muito obrigada por todo apoio, ensinamentos, ajuda em todos os momentos de leve desespero que a gente sabe que eu sempre tenho! Jacqueline, minha querida amiga e companheira de orientadora, que é muito mais que uma simples amiga e confidente, obrigada por todos os momentos que vivemos juntas até aqui. Bel, miga muito obrigada por ter respondido todas as minhas mensagens de socorro! Muitas das coisas que aprendi nessa vida de pesquisa, foi graças a sua paciência e maestria de ensinar, com toda certeza você está no caminho certo.

Aos meus amigos e companheiros da turma de Doutorado, Bruna, Carlos, Monica, Marcela, Thais, Claudia, Sabrina, Lais, e Camila Jabr, por esse tempo de convívio na sala de aula, nas clínicas e nos labs da vida, nossa turma sempre foi muito unida, e espero que continuemos juntos por muitos anos!

A minha amiga Analú, minha querida bff., por estar sempre comigo, em todos os momentos da minha vida, por me amar, e sempre ajudar. Obrigada por ser minha irmã

de pais diferentes, por ser luz e bondade por onde passa. Tenho muito orgulho da pessoa que você se torna a cada dia. O seu cuidado e amor em tudo que faz, com o seu jeito único de ser, te faz esse ser tão especial. Amo o quanto somos parecidas, você é uma parte essencial no meu mundo. Te amo!

A minha amiga Vivi, obrigada por sempre ser serenidade e plenitude nos meus dias. Minha vida se tornou melhor depois da sua amizade. Você é uma inspiração de profissional que eu sempre vou me inspirar. Amo você.

A minha amiga Bia, minha amiga de todas as horas. Quero sempre alguém como você do meu lado. Tão inteligente e bondosa. O mundo precisa de mais Bias para ser um lugar melhor. Eu amo o jeito que a gente se entende e se completa, você foi uma das mais lindas amizades que fiz na pós-graduação. Tenho muita sorte que nossos caminhos foram cruzados, como a gente sempre fala, nosso encontro foi de almas. Amo você!

A minha amiga Claudia, obrigada por todos esses anos ao meu lado. Agradeço ao papai do céu por ter te colado em minha vida, uma pessoa que tem o melhor carisma, energia e é luz por onde passa, você realmente é diferenciada. Espero que nosso laço que foi construído seja eterno. Amo que você é nossa rainha da biologia molecular, que Deus continue te guiando e abençoando para sempre realizar os seus sonhos. Amo você!

Ao meu amigo e professor Túlio (Tulião), por sempre esclarecer minhas dúvidas, por ter realizado minha estatística, e por nunca negar seu conhecimento. Todos os alunos que tiverem a honra de ter aula com você terão muita sorte. Você realmente ama o que faz! Te amo!

Aos meus amigos que a Odontologia me presenteou, Marcela, Sarah, Maitê, Marina, Gabi, Jussara, Vera, Bruna, Paulo, Letícia. Sou muito grata por meu caminho ter cruzado com o de vocês.

Agradeço aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia com ênfase em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese desta

Faculdade, pelo amor a profissão, por serem mais que professores, por todos os ensinamentos e serem pessoas admiráveis.

Aos Funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese desta Faculdade, em especial à chiquetosa Miriam, Martinha e Tânia, por fazerem de nosso departamento um lugar melhor, por toda a disposição por me ajudarem.

Agradeço a todos os funcionários desta Faculdade, as meninas da limpeza, secretárias, porteiros, seguranças, que se esforçam ao máximo para fazer desse lugar, um ambiente tão agradável. Agradeço as funcionárias da biblioteca, por todo carinho e paciência que realizam seu trabalho.

Agradeço aos amigos de Laboratório, Paula, Geisiane, Bruna e Lígia, muito obrigada por toda ajuda, e troca de conhecimentos!

Aos Professores Membros da Banca Examinadora, por terem aceitado tão prontamente meu convite para participar da avaliação deste trabalho. Ao tão especial professor Gelson, um grande exemplo desde as aulas da graduação, o admiro muito por toda humanidade e excelência ao transmitir o conhecimento. À professora Renata, por ter aceitado esse convite, e por toda dedicação e sabedoria que passa por todas as vezes que nos encontramos. Ao professor Maurício por ser essa inspiração a nós da pós-graduação, por ser tão dedicado e competente trilhando seu caminho acadêmico. À Professora Ana Carolina, por ser amiga e exemplo de profissional. O meu muito obrigada!

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 Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP e a Prof. Dr. Edson Alves de Campos, diretor dessa instituição.

“Todo mundo tem dentro de si um fragmento de boas notícias. A boa notícia é que você não sabe quão extraordinário você pode ser! O quanto você pode amar! O que você pode executar! E qual é o seu potencial!

Anne Frank*

* Frank A. Diário de Anne Frank. Tradução Alves Calado. Rio de Janeiro: Record; 1995.

Tasso CO. Influência de substâncias antimicrobianas sobre biofilmes simples e misto formados em resinas acrílicas para base e reembasamento de prótese [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de substâncias antimicrobianas sobre biofilmes simples e misto (*C. albicans* e *S. mutans*) formados em resinas acrílicas para base e reembasamento de prótese. Amostras das resinas foram confeccionadas (14 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura) e divididas em grupos: G1: imersão em solução de sabonete líquido desinfetante por 7, 14 e 28 dias (por 8 horas a temperatura ambiente, seguido de imersão em PBS (phosphate buffered saline) por mais 16 horas à 37 °C, simulando a desinfecção noturna das próteses, sendo a solução desinfetante e o PBS trocados diariamente) antes da formação dos biofilmes simples e misto; G2: imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (controle positivo) por 7, 14 e 28 dias (por 8 horas a temperatura ambiente, seguido de imersão em PBS por mais 16 horas à 37 °C, simulando a desinfecção noturna das próteses, sendo a solução desinfetante e o PBS trocados diariamente) antes da formação dos biofilmes simples e misto; G3: imersão em PBS (controle negativo) por 7, 14 e 28 dias (por 8 horas a temperatura ambiente, seguido da troca após 16 horas, à 37 °C) antes da formação dos biofilmes simples e misto; G4: imersão em solução de sabonete líquido desinfetante por 8 horas depois da formação dos biofilmes simples e misto; G5: imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (controle positivo) por 8 horas depois da formação dos biofilmes simples e misto; G6: imersão em PBS (controle negativo) por 8 horas a temperatura ambiente, após a formação dos biofilmes simples e misto; G7: tratamento superficial com solução de extrato de *Cryptocarya moschatta* depois da formação do biofilme, por 2 horas; G8: tratamento com solução de Nistatina a 100.000 IU/mL (controle positivo) depois da formação do biofilme, por 2 horas; G9: tratamento com solução de antibiótico (controle positivo) depois da formação do biofilme, por 2 horas; G10: tratamento PBS (controle negativo) depois da formação do biofilme, por 2 horas. Biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. mutans* foram formados sobre as amostras em todos os grupos. Para a análise da atividade antimicrobiana, os seguintes testes foram realizados: contagem de colônias, avaliação do metabolismo celular, análise quantitativa e qualitativa por microscopia de varredura confocal a laser. Os ensaios foram realizados em triplicata (3 amostras de cada resina e para cada teste), em 3 ocasiões diferentes (n=9). Os dados foram submetidos ao método estatístico mais adequado para cada teste e o nível de significância de 5% foi selecionado ($\alpha=0.05$). Os resultados mostraram que a solução de sabonete Lifebuoy® foi capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colônias e o metabolismo celular dos biofilmes simples e misto de *C. albicans*, *S. mutans* formados sobre amostras de ambas as resinas, comprovando seu efeito antimicrobiano, tanto para o protocolo de prevenção como também para o protocolo de desinfecção. Em relação à eficácia do extrato de *C. moschata*, houve redução do número de unidades formadoras de colônias e do metabolismo celular, para biofilmes simples e misto formados sobre as amostras de resinas para base e reembasamento de próteses. Concluiu-se que a solução de Lifebuoy® e o tratamento com extrato de *C. moschata* foram eficazes na redução dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre amostras de resina acrílica para base e reembasador de próteses.

Palavras – chave: Biofilmes. Estomatite sob prótese. Resinas acrílicas. *Candida albicans*. *Streptococcus mutans*.

Tasso CO. Influence of antimicrobial substances on single and mixed biofilms formed in denture base and reline acrylic resin [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of antimicrobial substances on single and mixed biofilms of *C. albicans* and *S. mutans* formed on denture base and reline acrylic resins. Samples were prepared (14 mm in diameter and 1.2 mm thick) and divided into groups: G1: immersion in disinfectant liquid soap Lifebuoy solution for 7, 14 and 28 days (for 8 hours at room temperature, followed by immersion in PBS (phosphate buffered saline) for another 16 hours at 37 °C, simulating the nocturnal disinfection of the prostheses, with the disinfectant solution and PBS changed daily) before the formation of single and mixed biofilms; G2: immersion in 0.5% sodium hypochlorite solution (positive control) for 7, 14 and 28 days (for 8 hours at room temperature, followed by immersion in PBS for another 16 hours at 37 °C, simulating the nocturnal disinfection of the prostheses, with the disinfectant solution and PBS changed daily) before the formation of single and mixed biofilms; G3: immersion in PBS (negative control) for 7, 14 and 28 days (for 8 hours at room temperature, followed by the change after 16 hours, at 37 °C) before the formation of single and mixed biofilms; G4: immersion in disinfectant liquid soap solution for 8 hours after the formation of single and mixed biofilms; G5: immersion in 0.5% sodium hypochlorite solution (positive control) for 8 hours after the formation of single and mixed biofilms; G6: immersion in PBS (negative control) for 8 hours at room temperature, after the formation of single and mixed biofilms; G7: surface treatment with *Cryptocarya moschatta* extract solution after biofilm formation, for 2 hours; G8: treatment with Nistatina at 100.000 IU/mL (positive control) after biofilm formation, for 2 hours; G9: treatment with antibiotic solution (positive control) after biofilm formation, for 2 hours; G10: treatment with PBS (negative control) after biofilm formation, for 2 hours; Single and mixed biofilms of *C. albicans* and *S. mutans* were formed on samples in all groups. For the analysis of antimicrobial activity, the following tests were performed: colony forming units count, evaluation of cell metabolism, quantitative and qualitative analysis by confocal laser scanning microscopy. The tests were performed in triplicate (3 samples of each resin and for each test), on 3 different occasions (n=9). The data were submitted to the most appropriate statistical method for each test and the significance level of 5% ($\alpha=0.05$) was selected. The results showed that the Lifebuoy® soap solution was able to reduce the number of colonies forming units and the cellular metabolism of single and mixed biofilms of *C. albicans* and *S. mutans* formed on samples of both resins, proving its antimicrobial effect, both for the prevention protocol and for the disinfection protocol. Regarding the effectiveness of the *C. moschata* extract, there was a reduction on the number of colony formation units and on cellular metabolism, for both simple and mixed biofilms formed over the samples for denture base and reline acrylic resins. It was concluded that the Lifebuoy® solution was effective in reducing single and mixed biofilms of *C. albicans* and *S. mutans* formed on samples of denture base and reline acrylic resin.

Keywords: Biofilms. Stomatitis denture. Acrylic resins. *Candida albicans*. *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
4 MATERIAL E MÉTODO	25
4.1 Estudo I	25
4.1.1 Diluição do sabonete Lifebuoy® para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
4.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da solução de Lifebuoy®	26
4.1.3 Confeccção das amostras	29
4.1.4 Medida da rugosidade superficial para padronização das amostras	30
4.1.5 Grupos experimentais	30
4.1.6 Solução de sabonete líquido desinfetante	31
4.1.7 Capacidade de formação de biofilme (método de prevenção)	32
4.1.8 Capacidade de redução de biofilme (método de desinfecção)	32
4.1.9 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	33
4.1.10 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste Alamar Blue®	34
4.2 Estudo II	35
4.2.1 Confeccção das amostras	35
4.2.2 Grupos experimentais	35
4.2.3 Preparo das soluções	35
4.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para as células planctônicas	36
4.2.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima das células em biofilme (CFMb)	36
4.2.6 Efeito do protocolo de tratamento sobre os biofilmes	37
4.2.7 Contagem do número de colônias viáveis (UFC)	37
4.2.8 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®	38
4.2.9 Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal	38
4.2.10 Avaliação da viabilidade celular por meio de Microscopia de Varredura Confocal a Laser (MVCL)	39
4.2.11 Análise estatística	39

5 RESULTADO	40
5.1 Estudo I	40
5.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da solução de Lifebuoy®.....	40
5.1.2 Capacidade de formação dos biofilmes simples e misto sobre resinas para base e reembasamento de próteses após imersão em soluções desinfetantes, como método de prevenção.....	41
5.1.3 Capacidade de remoção dos biofilmes simples e misto sobre resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses após imersão em solução de sabonete líquido desinfetante, como método de desinfecção.....	47
5.2 Estudo II	54
5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para as células planctônicas.....	54
5.2.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima das células em biofilme (CFMb).....	54
5.2.3 Contagem do número de Unidade Formadoras de Colônias (UFC/mL).....	54
5.2.4 Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal	61
5.2.5 Avaliação da viabilidade celular por meio de Microscopia de Varredura Confocal a Laser (MVCL)	64
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

Considerando os avanços na tecnologia médica que permitem o tratamento de várias doenças, e a maior preocupação sobre ter hábitos saudáveis, estudos atuais têm mostrado que a expectativa de vida global vem aumentando^{1,2}. Com o aumento da expectativa de vida, é provável que a demanda por próteses removíveis também continue necessária, apesar da constante conscientização sobre saúde bucal em pacientes idosos³. No último resultado do SBBrasil de 2010 foi demonstrado que na faixa etária de 65 a 74 anos, apenas 23,5% de idosos não usavam algum tipo de prótese dentária superior, sendo o maior percentual (31,4%) na Região Nordeste, e o menor (16,5%), na Região Sul. A porcentagem de usuários de prótese total foi de 63,1% para o Brasil, variando de 65,3% na Região Sul a 56,1% na Região Nordeste⁴.

O polimetilmetacrilato (PMMA) é o polímero mais comumente usado em laboratórios odontológicos para confecção de próteses dentárias e para realização de reparos. Em clínicas odontológicas também é o mais utilizado para o reembasamentos das próteses^{4,5}. Essas resinas são convencionalmente apresentadas na forma de pó-líquido. O pó contém um polímero transparente (PMMA), no entanto aditivos como pigmentos e fibras sintéticas de nylon, ou acrílico são adicionados para melhorar as propriedades físicas e estéticas. O componente líquido contém um monômero de metacrilato de metila, que é combinado com agentes de reticulação e inibidores^{4,6}.

Em função da reabsorção óssea, que é um processo contínuo, muitas vezes o reembasamento dessas próteses dentárias se faz necessário. Pode-se realizar o reembasamento direto ou indireto. O reembasamento direto é realizado em consultório utilizando-se resinas acrílicas autopolimerizáveis especialmente formuladas para essa finalidade. Esse método, também denominado reembasamento imediato, pode ser realizado pela utilização de materiais rígidos ou resilientes e elimina as fases de inclusão e prensagem necessárias à realização do reembasamento do tipo mediato (ou indireto), sendo, por esse motivo, mais fácil, rápido e de custo acessível. O reembasamento direto das próteses é um processo relativamente simples, barato e melhora significativamente a satisfação dos pacientes⁷. Porém, estudos comprovam que os reembasadores possuem maior rugosidade superficial em comparação às resinas de base, fato que pode contribuir para o acúmulo de biofilme⁸.

¹⁰. Além disso, com o uso diário, os materiais resinosos são expostos aos ingredientes da saliva e mudanças de temperatura na cavidade bucal. Esses fatores, associados aos hábitos inadequados de higiene, também podem favorecer o acúmulo de biofilme na superfície desses materiais, ocasionando a estomatite protética^{11,12}.

A etiologia da estomatite protética mostra-se extremamente variável, sendo considerada multifatorial. O uso prolongado de próteses dentárias, a má higiene e o trauma da mucosa são fatores locais importantes que contribuem para o desenvolvimento e manutenção da doença¹¹. Outro importante fator para o seu desenvolvimento é o ambiente favorável para o crescimento de *Candida* que é criado sob as próteses dentárias. O microambiente da mucosa palatina portadora da prótese é de baixo oxigênio, em grande parte desprovido de saliva, e é de pH ácido, o que promove a atividade e secreção de enzimas hidrolíticas, aspartil proteinases (SAPs) secretadas, fosfolipases e lipases que causam a degradação tecidual¹³⁻¹⁹. Além disso, a adesão de microrganismos na superfície interna das próteses ou dos reembasadores e posterior formação do biofilme, principalmente de espécies de *Candida*, são fatores primordiais para o surgimento da estomatite protética.

A cavidade bucal é um habitat excepcionalmente complexo que abriga comunidades microbianas únicas e diversas que coexistem em um equilíbrio. Qualquer distúrbio neste ecossistema que resulte no domínio de uma espécie patogênica (disbiose), pode levar ao desenvolvimento de doenças bucais^{20,21}. Na cavidade oral, a co-adesão de *C. albicans* com bactérias é essencial para a persistência e sobrevivência de *C. albicans* e, portanto, essas interações podem aumentar a colonização no hospedeiro^{22,23}.

A virulência de *C. albicans* é atribuída à sua capacidade de crescer em diversas formas morfológicas: levedura, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. As hifas alongadas evadem ou escapam das células fagocíticas e conseguem fazer com que as células de levedura se disseminem no tecido e na corrente sanguínea, contribuindo como um fator importante na sobrevivência de *C. albicans* em vários locais ou condições. Além dessa capacidade morfológica, outro fator que pode aumentar a virulência de *C. albicans* são as interações com microrganismos orais como *S. mutans*, isso justifica a importância em estudar os biofilmes multiespécies em superfícies²⁴.

As interações fúngico-bacterianas e seu papel na saúde e na doença estão ganhando notoriedade²⁵. Essa interação pode ser do tipo comensalismo cooperativo,

quando os microrganismos podem fornecer substratos e/ou metabólitos estimulando assim o crescimento de ambas as espécies. Isso ocorre entre *C. albicans* e *S. mutans*. O fungo metaboliza a sacarose de forma ineficiente, mas é beneficiado por produtos da hidrólise de sacarose (glicose e frutose) realizada por *S. mutans*. A presença de *C. albicans* no biofilme aumenta a formação de exopolissacarídeos (EPS), e dos glucanos, aumentando a adesão e a coesão bacteriana. Também forma uma matriz limitadora da difusão que protege as bactérias e ajuda a acidificar o microambiente local. Dessa forma, o acúmulo e formação de microcolônias de *S. mutans* se torna maior^{26,27}.

A estomatite pode ser tratada usualmente por meio da utilização de medicamentos antifúngicos, da orientação ao paciente quanto à higienização da prótese e verificação da necessidade da troca. Agentes antifúngicos usados em excesso pode resultar em espécies resistentes às drogas²⁸. A prescrição de antifúngicas deve ser vista com cautela. Alguns podem ser tóxicos, ter baixa efetividade e, como já mencionado, podem induzir a resistência fúngica²⁸. Assim, novas pesquisas buscam terapias alternativas para o tratamento de infecções, sendo a fitoterapia uma alternativa viável para atingir este objetivo^{29,30}.

O gênero *Cryptocarya* pertence à família Pantropical *Lauraceae*, da qual várias espécies crescem nas florestas tropicais dos países da orla do Pacífico. Diferentes tipos de produtos naturais, apresentando considerável diversidade estrutural, têm sido isolados de espécies desse gênero, incluindo flavonóides e pironas³¹. Várias espécies de *Cryptocarya* foram estudadas com foco em sua fitoquímica e farmacologia³²⁻³⁴. Estudos prévios observaram atividade antifúngica de *C. moschata* e *C. mandioccana*³⁵⁻³⁷. Recentemente, um estudo desenvolvido por Zoccolotti et al.²⁹ (2021), mostrou que os extratos de *C. moschata* e *C. mandioccana* foram capazes de reduzir o metabolismo celular e o número de unidades formadoras de colônias do biofilme de *C. albicans* formado sobre resina acrílica para base de próteses. Além disso, em estudo in vivo, observou-se que, histologicamente, o extrato de *C. moschata* não causou dano celular na língua dos camundongos, além de diminuir o biofilme de *C. albicans*, semelhante ao grupo tratado com nistatina, usado como controle positivo³⁸.

Apesar dos resultados promissores em relação a fitoquímica e farmacologia de várias espécies de *Cryptocarya*, nenhum estudo foi encontrado na literatura a respeito

de seu efeito sobre biofilme misto de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* formados sobre amostras de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses. Os fatores supracitados demonstram a importância do presente estudo na elaboração de um tratamento natural e de baixo custo para a estomatite protética.

Dentre os métodos de prevenção, a eliminação e/ou redução do biofilme é fator primordial. Biofilmes são comunidades microbianas altamente organizadas, aderidas a uma superfície biótica (mucosa oral) ou abiótica (superfície das próteses), e protegidas por uma matriz polimérica extracelular^{39,40}. Devido à interação das células microbianas e a presença da matriz polimérica extracelular, o biofilme possui propriedades diferentes dos microrganismos que se encontram em forma livre. Na forma de biofilme, as células apresentam benefícios, tais como: retenção de água e resistência a dessecação, captação e armazenamento de nutrientes, adesão ao sítio de infecção, proteção física contra o sistema de defesa do hospedeiro e antimicrobianos⁴¹. A eliminação e/ou redução do biofilme pode ser realizada mecanicamente, quimicamente ou pela combinação de ambas⁴².

Estratégias de desinfecção por soluções químicas têm sido frequentemente recomendadas devido a sua efetividade em reduzir ou eliminar diferentes microrganismos⁴³. Um limpador químico ideal para próteses dentárias deve inibir ou reduzir o acúmulo de biofilmes, possuir atividade antifúngica e antibacteriana, ter um odor agradável, ser de baixo custo, fácil manipulação e não tóxico^{44,45}. Existem alguns tipos de produtos químicos utilizados para a desinfecção das próteses, como digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio, vinagre e álcool⁴⁶⁻⁴⁹. Porém, esses agentes possuem algumas desvantagens e restrições de uso como manchamento e branqueamento das resinas, efeitos citotóxicos e corrosão da estrutura metálica em próteses parciais removíveis⁵⁰⁻⁵³.

Como alternativa, estudos foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da imersão em sabonetes líquidos desinfetantes sobre as propriedades físicas, mecânicas e biológicas de resinas acrílicas para base e reembasamento de prótese, bem como sobre dentes artificiais⁵⁴⁻⁵⁷. Zoccolotti et al.⁵⁴ (2018) observaram que alguns sabonetes líquidos desinfetantes (Dettol, Lifebuoy®, Protex) foram eficazes na redução do biofilme simples formado na superfície de amostras de resina acrílica. Além disso, o mesmo estudo concluiu que os sabonetes testados não foram tóxicos e não promoveram alteração na rugosidade das amostras. Em 2019, Zoccolotti et al.⁵⁵

concluíram que os sabonetes líquidos desinfetantes não alteraram significativamente a dureza, a rugosidade e a estabilidade da cor de dentes artificiais testados, tornando-se uma alternativa para a desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais. Diante dos resultados laboratoriais promissores, Tasso et al.⁵⁶ (2020) realizaram um estudo clínico controlado com o objetivo de avaliar a efetividade das soluções de dois sabonetes líquidos desinfetantes (Dettol e Lifebuoy®) no controle do biofilme presente em próteses totais superiores removíveis. Os autores concluíram que as soluções do sabonete Lifebuoy® e do sabonete Dettol tiveram resultados semelhantes e foram eficazes na redução do biofilme. Em outro estudo, observou-se que a imersão de um reembasador de próteses no sabonete líquido Lifebuoy® reduziu o biofilme formado nas amostras e a imersão não afetou a citotoxicidade do material⁵⁷. Esses estudos avaliaram as propriedades biológicas em relação às cepas de *C. albicans* e isolados clínicos das espécies de *Candida*. Nenhum estudo foi encontrado na literatura avaliando o efeito dos sabonetes desinfetantes sobre biofilme misto de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, o que demonstra a importância do presente estudo na elaboração de um protocolo de desinfecção acessível e de baixo custo para usuários de próteses removíveis parciais ou totais.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a influência de substâncias antimicrobianas sobre biofilmes simples e misto formado em resinas acrílicas para base e reembasamento de prótese.

2.1 Objetivos Específicos

Estudo I: Efeito da solução de sabonete Lifebuoy® sobre os biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans*:

- Avaliar o efeito da imersão de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses em soluções desinfetantes por 7, 14 e 28 dias sobre a capacidade de formação de biofilmes simples e misto, como método de prevenção;
- Avaliar a capacidade de remoção dos biofilmes simples e misto formados sobre resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses após imersão em soluções desinfetantes por 8 horas, como método de desinfecção.

Estudo II: Efeito do protocolo de tratamento com *Cryptocarya moschatta* sobre os biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans*:

- Avaliar o efeito da aplicação superficial de solução de extrato de *Cryptocarya moschatta* sobre biofilmes simples e misto formados em resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses, como protocolo de tratamento.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Um distúrbio comum que afeta usuários de próteses é a estomatite protética, a qual é caracterizada por uma inflamação eritematosa que afeta as áreas da mucosa oral que estão em contato direto com a prótese⁵⁸. A incidência de pacientes que usam próteses removíveis e que apresentam a estomatite protética é de até dois terços ou mais, e apesar desse número ser tão alto, a sintomatologia muitas vezes é inexistente e apenas uma minoria dos pacientes relatam algum tipo de desconforto, como dor, coceira ou até mesmo algum tipo de queimação⁵⁹.

Apesar da alta taxa da presença da estomatite protética, a sua etiologia é pouco compreendida, alguns fatores como o trauma da mucosa devido ao ajuste inadequado da prótese total, aumento da idade do paciente, próteses antigas e mal ajustadas, infecção bacteriana e fúngica (principalmente por espécies de *Candida*) e má higiene da prótese estão comumente relacionados a presença da doença, porém, a relação clara de causa e efeito ainda não foi demonstrada, e a ideia mais aceita na atualidade é que se trata de uma doença multifatorial⁶⁰⁻⁶².

Em 2011, Gendreau e Loewy⁵⁸ publicaram uma revisão de literatura, onde demonstram a relação causal de alguns fatores de risco aceitos para a estomatite protética. No estudo publicado por Budtz-Jorgensen e Bertram⁶³ (1970) foi demonstrado como próteses desajustadas podem causar algum tipo de irritação, ou uma associação de inflamação localizada simples na mucosa por trauma, podem ser um alto fator de risco para o desenvolvimento da doença, assim próteses mal adaptadas foram associadas a um maior risco de estomatite protética.

Emami et al.⁶⁴ (2014) avaliaram a hipótese de que o aumento da pressão oclusal pode contribuir para o trauma da mucosa na estomatite protética. Esses autores compararam a incidência de estomatite protética entre 173 pacientes idosos edêntulos que receberam aleatoriamente novas próteses convencionais maxilares e mandibulares (n = 76) com aqueles que receberam overdentures mandibulares com dois implantes (n = 97), o que proporcionou melhor estabilidade e ajuste e redução oclusal. Após 1 ano, a incidência geral de estomatite por dentadura foi de 64%, com gravidade aproximadamente igualmente dividida entre Tipo I e Tipo II de Newton; no entanto, os pacientes com próteses convencionais foram significativamente mais

propensos a ter estomatite protética do que aqueles com overdentures mandibulares (OR: 4,52; IC 95%: 2,24-9,14; $p < 0,0001$).

Outro fator de risco para a estomatite protética que é aceito na literatura é a má higiene das próteses, Estudos relatam que muitos usuários de próteses tentam manter a higiene apenas através da escovação, tal como faziam com a dentição natural, porém, já é elucidado na literatura que para se ter uma higienização eficiente outros métodos, como o uso de soluções desinfetantes comerciais ou a imersão da prótese em hipoclorito de sódio diluído, são necessários como parte da manutenção diária⁶⁵.

A cavidade oral é considerada um ambiente complexo, que a alta umidade e temperatura moderada juntamente com a abundância de nutrientes podem promover a sobrevivência de vários tipos de microrganismos que podem ser capazes de formar biofilmes microbianos⁶⁶. O desenvolvimento rápido de biofilme acontece em próteses que são mal higienizadas, ocorrendo assim a aderência e acúmulo de microrganismos patogênicos. O biofilme contém bactérias e leveduras que residem nas superfícies das próteses e podem colonizar a mucosa oral^{67,68}, tendo papel na inflamação oral associada à estomatite protética⁶⁹.

A própria utilização de uma prótese dentária pode ter papel importante no desenvolvimento de estomatite protética. A capacidade de bactérias e leveduras em colonizar os materiais dessas próteses é primordial para o início da doença, pois esses biofilmes se aderem às superfícies das próteses, formando um depósito de microrganismos, expondo continuamente a mucosa aos organismos contidos neste biofilme. Os principais componentes dos biofilmes formados na base das próteses são bactérias, com uma alta prevalência de *Streptococcus mutans*, enquanto as leveduras ocupam uma parte menor, porém não menos importante da flora microbiana total, destacando-se as espécies de *Candida*^{70,71}. Carlsson et al.⁷² (1969) através de seu estudo que as bactérias *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* são membros proeminentes da flora bacteriana em próteses dentárias. Foi verificado que se os pacientes edêntulos ficarem sem utilizar suas próteses por dois dias, a contagem dessas bactérias chegou a zero, indicando que a prótese dentária pode ser a principal ou única fonte desses organismos.

O progresso da formação do biofilme é iniciado através da ligação de baixa afinidade de células planctônicas a um substrato, seguido por alta adesão por meio de receptores específicos. Assim, microcolônias desenvolvem-se, ocorre divisão das

células ligadas ao substrato, seguida do recrutamento de novas células planctônicas, ocasionando o desenvolvimento de uma comunidade, podendo haver recrutamento de espécies bacterianas heterotípicas e/ou adesão por múltiplas espécies, levando à formação de comunidades multiespécies (polimicrobianas)⁷³. A sobrevivência dessas espécies em comunidades de biofilme, em relação às que permanecem em condições planctônicas, é abundante, visto que a matriz extracelular, formada por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), e a presença de células persistentes, as quais sobrevivem a baixas taxas metabólicas, causam sensibilidade reduzida aos agentes antimicrobianos⁷⁴.

Os biofilmes também são mais resistentes à remoção mecânica e à morte pelo sistema imune do hospedeiro⁷⁵. A densidade e a disposição de um biofilme podem ser afetadas por inúmeros fatores, dentre eles o pH, nutrientes, oxigênio, tempo de formação do biofilme, visto que um biofilme maduro, que cresce ao longo de dias, terá uma composição diferente de um biofilme que é mecanicamente removido e formado diariamente⁷⁶.

A contribuição dos biofilmes de *C. albicans* na etiologia da estomatite protética foi avaliada por Ramage et al.⁷⁷ (2004). Foram recolhidas amostras de biofilmes das próteses com swabs estéreis e isolados representativos de *C. albicans* recuperados foram utilizados para investigar a cinética do desenvolvimento do biofilme in vitro. Os biofilmes de *Candida* foram visualizados por MEV (microscopia eletrônica de varredura) diretamente sobre as amostras retiradas de próteses de pacientes com estomatite protética. Esses biofilmes mostraram uma propensão a aderir ao longo de rachaduras e imperfeições da resina acrílica. Os isolados clínicos de *C. albicans* foram capazes de formar biofilmes in vitro. O teste de suscetibilidade indicou que os biofilmes resultantes apresentaram resistência aumentada ao tratamento antifúngico. Concluiu-se que os biofilmes de *Candida* desempenham um papel importante na instalação de doenças infecciosas. A capacidade da *Candida* em se aderir a próteses de resina demonstrou ser o primeiro passo que pode levar ao desenvolvimento do processo infeccioso e que pode resultar em graus variados de estomatite protética da mucosa adjacente⁷⁷⁻⁷⁹.

A virulência de *C. albicans* é atribuída à sua capacidade de crescer em diversas formas morfológicas vegetativas: levedura, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. As hifas alongadas evadem ou escapam das células fagocíticas e conseguem fazer com que

as células de levedura se disseminem no tecido e na corrente sanguínea, contribuindo como um fator importante na sobrevivência de *C. albicans* em vários locais ou condições. Além dessa capacidade morfológica, outro fator que pode aumentar a virulência de *C. albicans* são as interações com microrganismos orais como *S. mutans*, isso justifica a importância em estudar os biofilmes multiespécies em superfícies⁸⁰.

Dessa forma, novos estudos que buscam avaliar a complexidade da interação fúngico-bacteriana é primordial para um melhor entendimento dessa relação e para alcançar estratégias mais eficazes e adequadas para o manejo da estomatite protética.

Quando a estomatite protética está presente, é necessário um tratamento curativo. Vários agentes antifúngicos podem ser utilizados, como o fluconazol, nistatina, anfotericina B, miconazol, cetoconazol, itraconazol e clotrimazol. Se usados corretamente, eles são efetivos contra a estomatite protética, porém tem diversos efeitos adversos relacionados, podendo causar hepatotoxicidade e até mesmo agir nos microrganismos os tornando resistentes⁸¹. A aplicação tópica de agentes antifúngicos, como a nistatina, é eficaz apenas por um curto. Além disso, esses agentes geralmente são afetados negativamente pelo fluxo de saliva, tendo um número muito elevado de recidiva da doença.

A resistência microbiana ao tratamento convencional com antifúngicos foi relatada como um fator alarmante. Para agravar esse problema, o arsenal terapêutico disponível é limitado e agentes antifúngicos comerciais têm efeitos adversos graves, como toxicidade renal e hepática. Novos compostos antifúngicos, ou mesmo substâncias capazes de interagir sinergicamente com os medicamentos são urgentemente necessários para complementar a terapia convencional. A possibilidade de quimiossensibilização de patógenos por meio de compostos naturais tem se mostrado promissora no sentido de aumentar a eficácia da terapia convencional. Sabe-se que os metabólitos secundários produzidos por plantas também podem atuar como agentes antifúngicos. Essas substâncias podem auxiliar na cicatrização de feridas e diminuir os sintomas em pacientes afetados por infecções fúngicas. Nesse contexto, a pesquisa de novos compostos com potencial antifúngico é necessária, sendo os de origem natural uma opção que tem sido aceita e solidificada na comunidade científica devido às suas propriedades e eficácia comprovadas⁸².

Vários produtos naturais possuem efeitos antifúngicos e antimicrobianos, podendo ser utilizados no combate à estomatite protética. Tais produtos geralmente são mais baratos, menos tóxicos e menos propensos a induzir resistência microbiana em comparação com às drogas sintéticas^{83,84}. Pinelli et al.⁸⁵ (2013) relataram que *Ricinus communis*, quando usado como enxaguante bucal 4 vezes ao dia, poderia combater a estomatite protética por diminuir a formação de biofilme⁸⁵. O extrato de própolis a 2%, quando adicionado a um gel oral, demonstrou efeitos anti-inflamatórios, curando as lesões causadas por infecções por *C. albicans*⁸⁶.

O gênero *Cryptocarya* pertence à família Pantropical *Lauraceae*, da qual várias espécies crescem nas florestas tropicais dos países da orla do Pacífico. Diferentes tipos de produtos naturais, apresentando considerável diversidade estrutural, têm sido isolados de espécies desse gênero, incluindo flavonóides e pironas⁸⁷.

Cryptocarya mandioccana (noz-moscada-do-brasil) é uma espécie de árvore de até 30 m de altura que está predominantemente distribuída ao longo da mata atlântica costeira do sul do Brasil. Seus frutos são distintos devido ao seu aroma e sabor marcantes e curativas. Sua casca também é usada medicinalmente contra cólicas e diarreia. O chá feito de suas sementes é usado contra dores e suas folhas esmagadas, contra fortes cólicas⁸⁸. Na região sudeste do Brasil, mais especificamente na região da Mata Atlântica, são encontradas sete espécies de *Cryptocarya*. Dentre as espécies existentes, o extrato etanólico da polpa de frutos verdes e sementes de *C. moschata* demonstrou atividade antifúngica⁸⁹. Além disso, em outros estudos, folhas obtidas de *C. moschata* e *C. mandioccana* também demonstraram atividade antifúngica⁹⁰.

Zoccolotti et al.²⁹ (2021) avaliaram a eficácia de extratos de espécies de *Cryptocarya* sobre biofilme de *Candida albicans* e sua biocompatibilidade. Biofilme maduro de *C. albicans* foi formado em amostras de resina acrílica para base de prótese e o efeito fungicida dos extratos foi avaliado pelo ensaio Alamar Blue®, contagem de unidades formadoras de colônias (CFU/mL). Os resultados mostraram redução significativa no metabolismo celular e no número de UFC/ml de *C. albicans* ($p < 0,05$). A concentração de 0,045 g/mL inibiu completamente o número de UFC/mL, comprovando assim a atividade antimicrobiana dos extratos de *Cryptocarya* no controle de *C. albicans* presente em amostras de resina acrílica para base de prótese.

Prevenir o desenvolvimento do biofilme nas próteses é a melhor estratégia para manter a higiene e evitar a estomatite protética. A higienização satisfatória de próteses oferece uma abordagem segura e eficaz para a remoção de biofilme. No entanto, a alta prevalência de estomatite protética entre usuários de próteses e sua associação com higiene insatisfatória sugere que apenas uma minoria de indivíduos realmente pratica uma limpeza adequada de suas próteses⁹¹.

A correta desinfecção das próteses removíveis parciais ou totais é considerada de extrema importância, visto que existem evidências científicas disponíveis que demonstram que os hábitos de má higiene podem estar fortemente relacionados ao desenvolvimento de infecções orais e sistêmicas⁹². Uma revisão sistemática publicada em 2014 abordou como os métodos de desinfecção podem ser tão eficazes quanto a terapia antifúngica quando a doença já está instalada, mostrando como a educação sobre a correta desinfecção é importante aos usuários de prótese para a manutenção da saúde⁶⁴.

A correta limpeza da prótese é importante não apenas para controlar a presença de biofilme, prevenindo a infecção da mucosa e o estabelecimento da doença, mas também para a longevidade e sucesso do tratamento realizado. A remoção do biofilme das próteses pode ser alcançada através da aplicação de diferentes tipos de práticas de higiene, incluindo métodos mecânicos, agentes químicos e irradiação ou combinação dos métodos acima mencionados. A escovação representa o método mecânico mais comumente aplicado, combinando a vantagem de simplicidade, eficácia e baixo custo, porém a desvantagem desse método, para muitos usuários de prótese, é a necessidade da destreza manual, podendo não ser totalmente eficaz usado unicamente⁹³.

Os agentes de limpeza química podem incluir uma ampla variedade: hipocloritos, peróxidos, enzimas, ácidos, medicamentos brutos e enxaguatórios bucais. Dispositivos ultrassônicos combinam a remoção mecânica de biofilme com o uso simultâneo de um agente químico⁹⁴. A irradiação de próteses por meio de terapia fotodinâmica ou aplicação de micro-ondas também tem sido descrita como métodos alternativos de desinfecção de próteses totais⁹⁵.

Um método considerado ideal de desinfecção de próteses deve, além da ação bactericida e fungicida, possuir a capacidade de manter inalteradas as propriedades físicas e mecânicas da base da prótese e dos dentes artificiais. Em particular, a

manutenção da cor e da estabilidade dimensional de um material de prótese é primordial para sua longevidade clínica⁹⁶.

Badaró et al., conduziram um estudo, in vitro, para verificar métodos de higiene da prótese total, usando uma combinação de escovação e imersão (em soluções químicas) de amostras em resina acrílica termopolimerizada por um curto período de tempo. As amostras foram confeccionadas com uma parte polida para simular a superfície de contato com a mucosa bucal, língua e lábios, e a outra face não foi polida para simular a superfície de contato com a mucosa oral do palato. Os grupos testados foram divididos em NaOCL a 0,5% e a 0,25%, solução de *Ricinus communis* a 10%, e solução salina como controle negativo. As amostras eram escovadas por 9 minutos em cada face (polida e não polida), e em seguida eram imersas por 20 minutos nas soluções testes. O procedimento de escovação foi realizado três vezes ao dia por 3 minutos em cada lado da amostra, e o procedimento de imersão foi realizado uma vez ao dia por 20 minutos, ambos durante 21 dias. Ao avaliar a rugosidade das superfícies, foi constatado que o uso das soluções promoveu alteração apenas na superfície polida das amostras. O NaOCl 0,5% promoveu uma alteração significativa maior na superfície, enquanto a concentração de 0,25% apresentou resultados intermediários, sugerindo uma relação entre a concentração da solução e a rugosidade superficial⁹⁷.

As características ideais de um agente para limpeza de próteses devem incluir: capacidade de remoção do biofilme e de manchas e ser antibacteriano e antifúngico para reduzir o nível do biofilme de patógenos potencialmente nocivos. Além disso, não deve ser tóxico, ser compatível com os materiais de prótese e não modificar ou degradar a superfície da resina acrílica da base de prótese ou dos dentes artificiais. Precisa agir em um período curto (≤ 8 horas), ser de fácil uso, para o paciente ou cuidador, e ter baixo custo⁹⁸.

A utilização de sabonetes líquidos como agente de desinfecção de próteses foi proposta por Zoccolotti et al.⁵⁴ (2018), com resultados muito promissores. O estudo avaliou as propriedades físicas e biológicas de uma resina acrílica para base de próteses após imersão em sabonetes antissépticos. Corpos de prova foram preparados, e armazenados em soluções distintas por 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Foram testadas as soluções: DW: água destilada a 37 ° C (grupo controle); DS: ciclos de imersão diária em detergente Dettol por 8 horas à temperatura ambiente, seguido de imersão em água destilada por 16 horas a 37 ° C; PS: ciclos de imersão diária no

sabão Protex, conforme descrito para o grupo anterior; LS: ciclos de imersão diária no sabonete Lifebuoy®, conforme descrito para o grupo DS. Os parâmetros avaliados foram a capacidade de formação de biofilme por *C. albicans*, e redução de biofilmes fúngicos pré-formados, citotoxicidade, rugosidade superficial, dureza e mudança de cor. Para a fase de adesão fúngica, o tipo de sabonete teve efeito estatisticamente significativo, mas após 24 horas, não foram encontradas diferenças entre as soluções ou entre os tempos de armazenamento. Em relação à eficácia da redução do biofilme, houve diferença significativa quando os grupos foram comparados entre si. Dettol e Lifebuoy® eliminaram o biofilme pré-formado nos corpos de prova. Além disso, todos os sabonetes foram classificados como não citotóxicos (na linhagem HaCaT), pois não houve diferença na viabilidade celular entre os diferentes grupos, exceto após 21 dias, quando houve diminuição da viabilidade celular, independentemente do tipo de sabão. Em relação à rugosidade, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Lifebuoy® diminuiu a dureza da resina, independentemente do tempo de armazenamento. Após 21 e 28 dias de armazenamento, houve um aumento no valor de dureza, independentemente do tipo de sabão. A cor das amostras, de acordo com os valores do *National Bureau of Standards*, variou de 0,27 a 0,58 (ou seja, alterações de cor imperceptíveis ou suaves). Em geral, os sabonetes desinfetantes não foram capazes de prevenir a formação de biofilme, mas todos os sabonetes foram eficazes na redução do biofilme pré-formado. Além disso, todos os sabões eram não citotóxicos e não alteraram a rugosidade superficial, e a dureza⁵⁴.

Em estudo clínico, Tasso et al.⁵⁶ (2020), avaliaram a eficácia de sabonetes desinfetantes líquidos na redução de microrganismos presentes em próteses totais superiores. Os pacientes selecionados (N = 28) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 7), e cada grupo foi submetido a todos os quatro tratamentos de desinfecção em uma ordem diferente. Os tratamentos de desinfecção avaliados foram: hipoclorito de sódio 0,5% (controle positivo); sabonete líquido Dettol; sabonete líquido Lifebuoy®; e solução salina tamponada com fosfato (controle negativo). Os pacientes foram orientados a imergir as próteses superiores na solução desinfetante por 8 horas (overnight) por 7 dias. Todas as soluções foram testadas em uma sequência randomizada com período de washout de 1 semana entre as soluções. Amostras de biofilme das próteses foram obtidas antes e após cada tratamento e o material microbiológico foi diluído e plaqueado em meio seletivo para *Candida spp.* A

contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi realizada em cada grupo. A maior incidência observada foi para *C. albicans*, que apresentou frequência entre 66% e 92%, seguida de *C. tropicalis*, com frequência entre 7% e 33%, em todos os grupos experimentais. O hipoclorito de sódio foi capaz de reduzir mais de 3 logs de microrganismos para todos os pacientes, mostrando alta eficácia antifúngica para as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*. Em relação aos grupos experimentais, ambos os sabonetes líquidos (Dettol e Lifebuoy®) foram eficazes na redução dos dois tipos de microrganismos. Concluiu-se que os sabonetes líquidos foram eficazes na redução do biofilme e podem ser uma alternativa para desinfecção de próteses removíveis parciais ou totais.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi dividido em dois estudos laboratoriais *in vitro*. No Estudo I, foram testadas as seguintes soluções: solução de sabonete líquido desinfetante Lifebuoy® 0,78%, como grupo experimental, hipoclorito de sódio a 0,5%, como controle positivo, e solução salina (PBS), como controle negativo. Nesse estudo dois protocolos foram avaliados: o protocolo de **prevenção**, onde realizamos imersões das amostras de resina de base e de resina reembasadora de próteses nas soluções em diferentes períodos, e analisamos a influência dessas imersões na formação de biofilmes, simples e misto; e o protocolo de **desinfecção**, utilizamos as mesmas soluções para analisar a influência delas em remover os biofilmes (simples e misto) pré-formados nas amostras. No Estudo II, foi avaliada a efetividade de uma solução de extrato de *Cryptocarya moschatta*, como protocolo de **tratamento** para a estomatite protética. Para esse protocolo utilizou-se a solução do extrato de *C. moschatta* a 0,045g/mL, como grupo experimental, a solução de nistatina 100.000 IU/mL e a solução de antibiótico Penicilina 10000 Units/mL como controles positivos, e a solução de PBS como controle negativo. Foi realizado a formação dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* sobre as amostras de resina de base e resina reembasadora de próteses, e depois colocadas em imersão por 2 horas nas soluções para posterior avaliação dos resultados.

A metodologia foi desenvolvida no laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Os procedimentos laboratoriais foram realizados por dois operadores dentro do grupo de pesquisa, para ter um maior controle das possíveis variações.

4.1 Estudo I

Neste estudo foi avaliada a ação das soluções desinfetantes sobre os biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. mutans* em amostras de resina de base e de reembasador rígido. Foram realizados dois protocolos. O protocolo de prevenção, onde as amostras foram imersas em diferentes períodos nas soluções avaliadas, e o biofilme foi formado após cada tempo, e então analisamos a influência dessas soluções. E no segundo protocolo a capacidade de remoção dos biofilmes formados sobre as amostras foi avaliada (protocolo de desinfecção).

4.1.1 Diluição do sabonete Lifebuoy® para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a realização da diluição do sabonete, foram utilizados 12 eppendorfs. No 1º eppendorf foram colocados 1400 µL do sabonete já diluído em 50% (50% sabonete + 50% de solução salina), no 2º eppendorf até o 12º eppendorf foram colocados 700 µL de solução salina. O sabonete foi sendo diluído retirando-se 700 µL de solução do 1º eppendorf para o 2º, e novamente do 2º eppendorf para o 3º e assim sucessivamente até o 12º⁵⁴.

4.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da solução de Lifebuoy®

A concentração inibitória mínima foi realizada após a reativação dos microrganismos. As cepas *Candida albicans* (ATCC® 5043) e *Streptococcus mutans* (UA159 ATCC 700610), estavam armazenadas em freezer -80 °C. Previamente aos experimentos, as cepas foram descongeladas e semeadas individualmente por meio da técnica de esgotamento em quadrante em um dos seguintes meios de cultura sólidos: Sabouraud Dextrose Agar com 5 mg/mL de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD, USA) para *C. albicans* (incubação a 37°C em estufa aeróbia por 48 horas) e Mitis Salivaris Agar (MSA, Difco, Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com 15% de sacarose e 0,2 UI/mL de bacitracina (MSB) para *S. mutans* (incubação em estufa de CO₂ 5% a 37°C durante o mesmo período de tempo).

Em seguida, com uma alça descartável estéril, em tubo com 10 mL de Yeast Nitrogen Base (YNB), foram inoculadas 05 colônias de *C. albicans*, e em outro tubo contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com 1% de glicose, foram inoculadas 10 colônias de *S. mutans*. Os tubos foram incubados overnight (16-18 horas) em estufa aeróbia (*C. albicans*) ou de CO₂ 5% (*S. mutans*) a 37°C e, assim, o pré-inóculo foi formado. Após esse período, os pré-inóculos foram diluídos em duas razões (1:10 e 1:20) para realização do inóculo. Sendo assim, para diluir na razão de 1:20, 500 µL do pré-inóculo, foram pipetados em um tubo com 9,5 mL de meio líquido para cada microrganismo. Na diluição na razão de 1:10, 1000 µL do pré-inóculo foram pipetados em um tubo de 9,0 mL dos mesmos meios líquidos. Alíquotas de 1 mL das diluições foram transferidas para cubetas, que foram levadas ao espectrofotômetro, onde foi lida a densidade óptica (DO) das diluições (a primeira leitura foi denominada

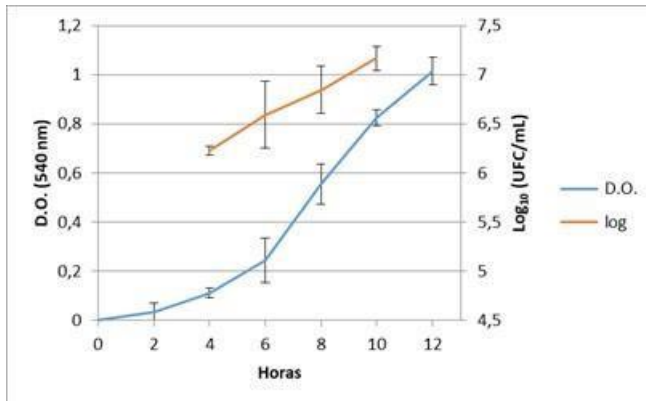
de DO^0 , e os comprimentos de onda utilizados foram de 540 nm para o fungo e 600 nm para a bactéria). Os tubos foram incubados em estufa aeróbia a 37°C (*C. albicans*) e em estufa de CO₂ 5% a 37°C (*S. mutans*) para o crescimento dos microrganismos até suas fases de mid-log das curvas de crescimento pré-estabelecidas (Figura 1 e 2). Após o período de 4 e 8 horas de incubação, as DOs de *S. mutans* e *C. albicans* foram verificadas, respectivamente. Confirmado o crescimento dos microrganismos, o tubo foi levado à centrifuga por 5 minutos para formação de “pellet”. Em seguida, foi lavado com PBS, levado novamente para centrífuga e novamente lavado com PBS. Após as duas lavagens os microrganismos foram suspensos novamente no meio RPMI suplementado com HEPES.

Utilizando uma placa de 96 poços para cada microrganismos, foram colocados 200 µL das diluições do sabonete em cada poço, em triplicata. Além disso, também em triplicata, foram acrescentados aos orifícios da placa os seguintes grupos: meio RPMI (meio RPMI no qual foi adicionado o microrganismo), sabonete e nistatina. Então, foi feita a leitura inicial no leitor de Eliza dos resultados sem o microrganismo.

Posteriormente, 10 µL do inóculo contendo os microrganismos foram adicionadas nos poços da placa (com exceção do controle de meio RPMI e do controle do sabonete). Em seguida, nova leitura no leitor de Elisa foi realizada. A placa de 96 poços foi então armazenada em estufa específica para cada microrganismo por 24

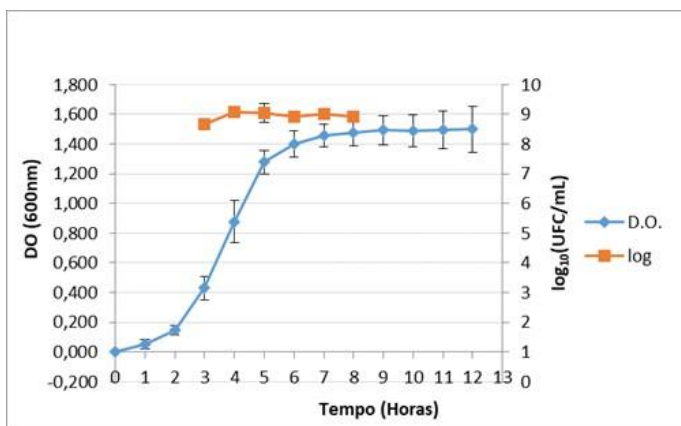
horas. Após este período, nova leitura em Elisa foi feita. O crescimento de microrganismo em cada poço foi visualmente analisado. Os poços nos quais o crescimento não foi observado foram plaqueados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e levados a estufa por 24 horas. Passando esse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias nas placas. A CIM foi confirmada no poço onde não houve crescimento de microrganismo após o plaqueamento.

Figura 1 - Curva de crescimento de *C. albicans*



Fonte: Protocolo laboratório de Microbiologia Aplicada da FOAr-UNESP

Figura 2 - Curva de crescimento de *S. mutans*



Fonte: Protocolo laboratório de Microbiologia Aplicada da FOAr-UNESP

4.1.3 Confeção das amostras

Os corpos de prova da resina acrílica para base de próteses Vipi Wave (Vipi Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil) foram confeccionados a partir de matrizes metálicas com 14 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura. Primeiramente, as matrizes metálicas foram colocadas em mufla própria para micro-ondas, entre duas placas de vidro. Essas placas foram previamente jateadas com óxido de alumínio para padronizar a rugosidade da superfície das amostras em aproximadamente $3,0 \mu\text{m}^{99}$, simulando a superfície interna das próteses. Posteriormente, a resina acrílica para base de próteses foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante em uma proporção de 14,6 g de pó com 6,5 mL de líquido, e a matriz foi, então, preenchida com a resina acrílica na fase plástica. A mufla foi levada à prensa hidráulica, a prensagem da resina acrílica foi realizada aplicando-se cargas graduais de 0,5, 0,8 e 1,25 tonelada-força (tnf). Nessa última carga, a mufla foi mantida sob a prensa por cerca de 30 minutos e fechada com auxílio de parafusos próprios¹⁰⁰.

Em seguida, os corpos de prova foram polimerizados em um forno de micro-ondas doméstico 500W (Brastemp da Amazônia SA, Manaus, AM, Brasil) por 20 minutos com potência de 20%, seguido por 5 minutos com potência de 80% (de acordo com as recomendações do fabricante). As muflas foram colocadas em bancada durante a noite para o resfriamento. Após a demuflagem, os excessos das amostras foram removidos com uma ponta Maxi-Cut (Lesfils de August Malleifer SA, Ballaigues, Suíça). Após a remoção dos excessos, todos os corpos de prova foram lavados em banho de ultrassom utilizando água destilada durante 15 minutos para remover os resíduos decorrentes do processo de confecção das amostras. Posteriormente, as amostras foram armazenadas por 48 horas a 37 °C.

Os corpos de prova do reembasador rígido Reembasador New Truliner (Bosworth) foram confeccionados, a partir de matrizes metálicas vazadas, em forma de discos contendo no seu interior um orifício medindo 14 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura. O material foi proporcionado e manipulado de acordo com instruções dos fabricantes. Após a manipulação, os materiais foram inseridos nas matrizes vazadas e prensados manualmente entre duas placas de vidro até o término da polimerização. As placas de vidro foram previamente jateadas com óxido de alumínio para padronizar a rugosidade da superfície das amostras em aproximadamente $3,0 \mu\text{m}^{99}$. Todas as amostras foram polimerizadas à temperatura ambiente para simular

um processo de reembasamento direto¹⁰¹. Para a remoção das amostras, um êmbolo foi posicionado na matriz de forma a deslocar o corpo de prova. Finalmente, o excesso de material de cada amostra foi recortado com tesoura. Posteriormente, as amostras foram armazenadas por 48 horas a 37 °C. Previamente aos testes microbiológicos, as amostras de resina acrílica e reembasador rígido foram expostas a luz ultravioleta sob condições secas durante 20 minutos (de cada lado) para desinfecção¹⁰²⁻¹⁰⁵. Este procedimento foi adotado por preservar as propriedades da resina acrílica. Os ensaios descritos a seguir foram realizados em triplicata (3 amostras de cada resina e para cada teste), em 3 ocasiões diferentes, perfazendo um total de 9 amostras por ensaio (n=9).

4.1.4 Medida da rugosidade superficial para padronização das amostras

Logo após a confecção, os corpos de prova foram lavados em banho de ultrassom, utilizando água destilada, durante 15 minutos, para remoção dos resíduos durante o processo de confecção e, em seguida, a rugosidade superficial foi mensurada com o intuito de padronizar as amostras e homogeneizar os grupos. Os corpos de prova foram submetidos à leitura da rugosidade superficial (Ra) por meio da utilização de um rugosímetro (Surftest SJ-401, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Santo Amaro, SP) com precisão de 0,01 µm. Três leituras para cada amostra foram realizadas, para obter a média. Foram selecionados para os testes microbiológicos, as amostras com rugosidade entre 2,7 e 3,7 µm¹⁰⁶.

4.1.5 Grupos experimentais

Os corpos de prova da resina acrílica para base de próteses e do reembasador rígido foram divididos em grupos experimentais (n=9) de acordo com os seguintes protocolos de prevenção e desinfecção:

G1: imersão em solução de sabonete líquido desinfetante por 7, 14 e 28 dias (por 8 horas a temperatura ambiente, simulando a desinfecção noturna das próteses, seguido de imersão em PBS por mais 16 horas à 37 °C, sendo a solução desinfetante e o PBS trocados diariamente) antes da formação dos biofilmes simples e misto;

G2: imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (controle positivo) por 7, 14 e 28 dias (por 8 horas a temperatura ambiente, simulando a desinfecção noturna das próteses, seguido de imersão em PBS por mais 16 horas à 37 °C, sendo a solução

desinfetante e o PBS trocados diariamente) antes da formação dos biofilmes simples e misto;

G3: imersão em PBS (controle negativo) por 7, 14 e 28 dias (por 8 horas a temperatura ambiente, seguido da troca após 16 horas, à 37 °C) antes da formação dos biofilmes simples e misto;

G4: imersão em solução de sabonete líquido desinfetante por 8 horas depois da formação dos biofilmes simples e misto;

G5: imersão em solução de solução de hipoclorito de sódio 0,5% (controle positivo) por 8 horas depois da formação dos biofilmes simples e misto;

G6: imersão em água destilada (controle negativo) por 8 horas a temperatura ambiente, após a formação dos biofilmes simples e misto.

4.1.6 Solução de sabonete líquido desinfetante

A escolha do sabonete líquido desinfetante e a sua concentração foram selecionadas de acordo com estudos prévios⁵⁴⁻⁵⁶. Assim, o efeito dos protocolos de prevenção e desinfecção utilizando-se o sabonete líquido Lifebuoy®, na concentração de 10 vezes encontradas no CIM (0,78%)⁵⁴ foi avaliado. A composição do sabonete se apresenta na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do sabonete antisséptico Lifebuoy® segundo os fabricantes

Lifebuoy®

Aqua, Sodium Laureth Sulfate,
Cocamidopropyl Betaine, Parfum,
Cocamide MEA, Acrylates Copolymer,
Sodium Chloride, PPG-9, Lactic Acid,
Glycol Distearate, Glycerin, Helianthus
Annuus Seed
Oil, Sodium Hydroxide, Tetrasodium
EDTA, Styrene/Acrylates Copolymer,
Dried Cream, Terpeneol, Thymol,
Methylchloroisothiazolinone,
Methylisothiazolinone, Alpha-Isomethyl
ionone, Benzyl Salicylate, Butylphenyl
Methylpropional, Citronellol, Coumarin,
Geraniol, Hexyl Cinnamal, Limonene,
Linalool

Fonte: Elaboração própria.

4.1.7 Capacidade de formação de biofilme (método de prevenção)

Para a análise da capacidade de formação de biofilme sobre as amostras previamente desinfetadas, primeiramente, os microrganismos foram reativados de acordo com metodologia descrita anteriormente, bem como foram feitos os inóculos e pré-inóculos (item 4.1.2). Os tubos contendo os microrganismos foram levados à centrifuga por 5 minutos para formação do “pellet”. Em seguida, o “pellet” foi lavado com PBS (phosphate-buffered saline) duas vezes. Após as duas lavagens, os microrganismos foram ressuspensos em meio RPMI-1640. Posteriormente, a densidade óptica da suspensão foi medida e normalizada para uma concentração de 1×10^6 células/mL¹⁰⁷, a qual foi utilizada nos ensaios descritos a seguir.

Após os períodos de imersão, de acordo com os grupos experimentais, as amostras de resina acrílica para base e reembasamento de próteses foram colocadas, individualmente, em orifícios de uma placa de 24 orifícios. Alíquotas de 750 µL da suspensão dos microrganismos (biofilmes simples) ou 1,5 µL das suspensões somadas de cada microrganismo (biofilme misto) preparadas previamente foram transferidas para os orifícios da placa de cultura, a qual foi incubada em estufa de crescimento com 5% de CO₂ a 37°C, durante 90 minutos, que correspondem à fase de adesão do biofilme. Após esse tempo, os poços das placas foram lavados duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS) estéril. Em seguida, BHI caldo suplementado 1% de glicose foi adicionado como meio de cultura, então a placa foi levada a estufa de crescimento com 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, metade do meio foi retirado dos orifícios das placas e o mesmo volume de meio de cultura novo foi adicionado para os biofilmes de maneira a repor nutrientes consumidos pelos microrganismos, e as placas foram levadas novamente à estufa de crescimento por mais 24 horas, totalizando um tempo de formação do biofilme de 48 horas.

4.1.8 Capacidade de redução de biofilme (método de desinfecção)

Semelhante ao teste de capacidade de formação de biofilme, foi realizada a etapa de reativação dos microrganismos e feitos os pré-inóculos e o inóculos, da mesma maneira como descrito na fase de determinação das concentrações inibitórias mínimas (item 4.1.2).

Primeiramente, para realização da desinfecção superficial, os corpos de prova (n=9) foram lavados em ultrassom por 20 minutos e colocados sobre um papel alumínio no fluxo laminar, sob luz ultravioleta, por mais 20 minutos de cada lado.

Após a desinfecção, as amostras foram individualmente colocadas em uma placa de 24 poços. Sobre as amostras, foram adicionados 750 uL de meio RPMI e 750 uL de alíquota do inóculo de *C. albicans*, para a formação de biofilme simples de *C. albicans*. Para a formação do biofilme simples de *S. mutans*, foram colocados sobre as amostras 750 uL de meio RPMI e 750 uL da alíquota do inóculo de *S. mutans*. Para a formação do biofilme misto, foram colocados 750 uL da alíquota do inóculo de *C. albicans* e 750 uL da alíquota do inóculo de *S. mutans*. Então, todas as placas foram incubadas por 90 minutos em estufas específicas para a fase de adesão das células.

Após esse tempo, removeu-se todo o conteúdo dos poços das placas e os mesmos foram lavados duas vezes com 1500 uL de PBS para remoção das células não aderidas aos corpos de prova. Adicionou-se 1500 uL de meio RPMI novo, e então as placas foram novamente incubadas para a maturação dos biofilmes por 48 horas (sendo o meio RPMI renovado após 24 horas).

O sabonete foi diluído em solução salina nas suas devidas concentrações inibitórias mínimas (CIM), e após as 48 horas de maturação do biofilme a placa foi removida da estufa e o meio de todos os poços retirados, lavados três vezes com solução PBS, e então colocadas as soluções de acordo com os grupos experimentais de desinfecção sendo: PBS (controle negativo), hipoclorito a 0,5% (controle positivo) e a solução de Lifebuoy® 10x a concentração inibitória mínima. Os corpos de prova ficaram imersos com as soluções por 8 horas em estufa de crescimento, simulando a desinfecção noturna das próteses.

4.1.9 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Após os procedimentos realizados nos itens 4.1.7 e 4.1.8, cada poço da placa foi lavado duas vezes com PBS e todos os corpos de prova foram removidos dos poços contaminados e transferidos para uma nova placa com o poço contendo 150 uL de solução salina estéril. Em seguida, os corpos de prova foram raspados com ponta de pipeta estéril por 1 minuto, para desprender o biofilme formado. Posteriormente, foram realizadas 4 diluições a partir desta solução resultante. Para isso, uma alíquota de 100 µL da solução resultante foi pipetada e transferida para um

eppendorf contendo 900 μL de solução salina estéril. Este último tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos e uma nova alíquota de 100 μL foi removida do mesmo e colocada em outro eppendorf contendo 900 μL de solução salina. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada corpo de prova e, desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas. Essas diluições foram utilizadas para semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 5 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol.

Foram pipetados 25 μL da diluição 10^{-3} e da diluição de 10^{-4} na placa de Petri. Após 48 horas de incubação a 37°C , as placas de Petri foram submetidas a contagem de colônias da forma padrão. A quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula: $\text{UFC/mL} = \text{Número de colônias} \times 10^n / q$. Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas.

4.1.10 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste Alamar Blue®

O metabolismo celular do biofilme de *C. albicans*, *S. mutans*, e do biofilme misto, após os procedimentos de prevenção e desinfecção, foi avaliado usando o teste Alamar Blue®, uma técnica que mede a viabilidade celular por meio da atividade das enzimas mitocondriais. A mudança de cor no teste representa a atividade metabólica do biofilme. Para avaliar a atividade das enzimas mitocondriais no procedimento de prevenção, após a formação dos biofilmes as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS e foram colocados 1500 μL meio de cultura novo em cada orifício da placa. Em seguida, foram acrescentados 150 μL de solução de Alamar Blue®. Para avaliar a atividade após o procedimento de desinfecção a solução de Alamar Blue® foi colocado da mesma maneira logo após 8 horas de imersão das amostras nas soluções ($n=9$).

As placas foram, então, colocadas nas estufas específicas a 37°C . Após 4 horas foi realizada a leitura de fluorescência. A fluorescência foi medida usando Fluoroskan Ascent a 560 nm (A_{560}) e 590 nm (A_{590}).

4.2 Estudo II

Neste estudo foi avaliado o efeito do protocolo de tratamento com extrato de *Cryptocarya moschatta* sobre os biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre amostras de resinas acrílicas de base e reembasador rígido.

4.2.1 Confeção das amostras

Amostras das resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses foram confeccionadas como descrito no item 4.1.3 do Estudo I.

4.2.2 Grupos experimentais

Após a confecção e armazenamento por 48 horas, as amostras de ambas as resinas foram distribuídas em grupos de acordo com o protocolo de tratamento (n=9), como a seguir:

G7: tratamento superficial com solução de extrato de *Cryptocarya moschatta* depois da formação do biofilme, por 2 horas;

G8: tratamento com solução de Nistatina a 100.000 ui/mL (controle positivo) depois da formação do biofilme, por 2 horas;

G9: tratamento com solução de antibiótico Penicilina 100000 Units/mL (controle positivo) depois da formação do biofilme, por 2 horas;

G10: tratamento solução de tampão fosfato-salino (PBS: controle negativo) depois da formação do biofilme, por 2 horas.

Para cada grupo descrito acima, foram realizadas análises para os biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.

4.2.3 Preparo das soluções

Na região sudeste do Brasil, mais especificamente na região de Mata Atlântica, são encontradas sete espécies de *Cryptocarya*. O estudo proposto se concentrou na avaliação dos extratos da *Cryptocarya moschatta*, estudada pelo Prof. Alberto J. Cavalheiro e colaboradores. O Dr. Cavalheiro se dedica ao estudo químico desse gênero desde 2000³². A coleta de *C. moschatta* foi realizada no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, Ubatuba - SP. As amostras coletadas foram secas em estufa com ventilação e renovação de ar, por 48 horas, na temperatura de 40 °C. Em seguida, foram pulverizadas em moinho de facas³⁴.

Os extratos vegetais foram preparados por sonicação (UAE – extração assistida por ultrassom) do material vegetal com solvente hidroalcoólico (água e etanol). Foram realizadas três extrações com o solvente, por sonicação, durante 20 minutos cada, de forma a obter-se extratos, utilizando proporção 1:10 (wt v-1) de matéria-prima: solvente. Depois, o extrato foi filtrado e concentrado com eliminação do solvente por liofilização. Os extratos brutos foram pesados e aliquotados para posteriormente serem diluídos em água com etanol nas proporções de interesse (Bandeira 26 et al., 2009, modificado).

4.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para as células planctônicas

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em placas de cultura de 96 poços, de acordo com o protocolo recomendado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 51). Os valores foram determinados pela incubação estática das suspensões do microrganismo, por 24 horas à 37°C, expostos às diferentes concentrações da planta medicinal avaliada neste estudo (*Cryptocarya moschatta* a 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%). Após 24 horas de contato, o valor da CIM foi dado pela menor concentração do extrato em mg/mL⁻¹, capaz de impedir o crescimento microbiano, observado pela turvação visual ou não do meio de cultura. A seguir, uma alíquota de cada orifício da placa foi diluída e plaqueada para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) por meio da contagem do número de colônias viáveis, sendo o valor da CFM determinado como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. As análises foram realizadas em triplicata em 3 ocasiões distintas.

4.2.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima das células em biofilme (CFMb)

Primeiramente, biofilmes simples e misto (48 horas), de ambos os microrganismos, foram formados em fundo de placa (96 orifícios), como descrito anteriormente. Após 48 horas, o meio foi aspirado e as células não aderentes foram removidas por lavagem dos biofilmes duas vezes com tampão PBS estéril. Após a formação do biofilme, foi adicionado a cada orifício da placa 200 µL das soluções de extratos de *Cryptocarya sp* em diferentes concentrações, partindo da concentração

do CIM para células planctônicas e aumentando a cada orifício gradativamente em 5x, 10x, 15x, até a concentração máxima possível (100%). Essas soluções foram mantidas em contato com o biofilme por um período de 24 horas à 37 °C.

Após o período de incubação, a CFMb foi determinada como sendo a menor concentração capaz de inibir o crescimento do biofilme, que foi observado pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias. As análises foram realizadas em triplicata em 3 ocasiões distintas.³⁸

4.2.6 Efeito do protocolo de tratamento sobre os biofilmes

Para avaliação do efeito do protocolo de tratamento com *Cryptocarya moschatta* sobre os biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans*, os microrganismos foram reativados e colocados sobre as amostras de resinas como descrito nos itens 4.1.2 e 4.1.8 do Estudo I. Posteriormente, os biofilmes foram tratados de acordo com os grupos experimentais (item 4.2.2).

Após o tempo de contato com as substâncias, o efeito do protocolo de tratamento sobre os biofilmes foi avaliado por meio da utilização dos seguintes testes: contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL), avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®, avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal e Microscopia de Varredura Confocal a Laser (MVCL).

4.2.7 Contagem do número de colônias viáveis (UFC)

As células de cada biofilme (simples e misto) foram desprendidas das amostras por meio de raspagem com o cell scraper durante 1 minuto. Em seguida essa suspensão do biofilme foi transferida para tubo com 900 µL com PBS. Posteriormente, o tubo foi agitado em agitador de bancada e 100 µL dessa solução foi transferida a um outro tubo contendo 900 µL de PBS realizando-se quatro diluições seriadas (1×10^4) para fungo e seis diluições (1×10^6) para bactéria. Alíquotas de 25 µL de cada uma dessas diluições foram semeadas em duplicata em placas de SDA, MSA para *C. albicans* e *S. mutans*, respectivamente, que foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Após esse período, as colônias foram contadas e os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foram calculados utilizando a fórmula: $\text{UFC/mL} = \text{Número de colônias} \times 10^n / q$. Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto

da diluição escolhida e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas. Os procedimentos foram realizados em triplicata em 3 ocasiões distintas (n=9).

4.2.8 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®

O metabolismo celular dos biofilmes simples e misto também foi monitorado usando o teste AlamarBlue®. Após a fase de adesão dos microrganismos sobre as amostras de resina, o biofilme foi lavado 2 vezes com PBS e, sobre as amostras, foram colocados 1500 µL meio de cultura novo em cada orifício da placa. Em seguida, foram acrescentados 150 µL de solução de AlamarBlue®. As placas foram, então, colocadas na incubadora de agitação orbital a 37°C e 76 rpm. Após 4 horas foi realizada a primeira leitura e 24 horas depois foi realizada a segunda leitura de fluorescência. A fluorescência das amostras foi medida usando Fluoroskan Ascent (Fluoroskan Ascent FI, Thermo Fisher Scientific, Marietta, Ohio, USA) a 560 nm (A560) e 590 nm (A590). Os procedimentos foram realizados em triplicata em 3 ocasiões distintas (n=9).

4.2.9 Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal

O dano nos componentes proteicos da matriz foi avaliado qualitativamente e quantitativamente utilizando o microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) e o Software ZEN BLUE 2.3 System. As amostras foram divididas em 12 slices, com ganho de 780 V e abertura de pinhole de 2,30 AU/ 85 µm. Para realização do ensaio, os biofilmes foram formados sobre as amostras de resina de base e reembasador e tratados conforme descrito anteriormente (item 4.2 do estudo II), de acordo com seus grupos experimentais. Após os tratamentos, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão PBS (200 µL) e posteriormente, 100 µL da solução de SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (Invitrogen™) foi adicionada em cada poço. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C durante 30 minutos, protegidas da luz. Após esse período, o marcador foi retirado das amostras, e em cada poço foram adicionados 100 µL do tampão PBS. A seguir, as amostras foram visualizadas no Microscópio de Fluorescência Confocal (excitação: 488 nm; detecção:

700 nm). Foram analisados campos equidistantes de uma mesma amostra e os poços foram analisados em objetiva de 10x de aumento.

4.2.10 Avaliação da viabilidade celular por meio de Microscopia de Varredura Confocal a Laser (MVCL)

Para este teste, os biofilmes foram formados sobre os corpos de prova, posicionados em placas de cultura de 24 orifícios, como descrito no item 4.1.8 do Estudo I (n=2). Posteriormente foram adicionados 10 mL de solução salina contendo 2 mL de corante Live/Dead (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), contendo SYTO-9 e Propidium Iodide (PI) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) sobre as amostras.

As placas com e sem os corpos de prova foram, então, incubadas por 15 minutos no escuro. A máxima excitação e emissão utilizada foi de aproximadamente 480/500 nm para SYTO-9 e 490/635 nm para PI. Posteriormente, imagens foram obtidas com um microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan), sendo as células vivas coradas em verde e as mortas em vermelho.

4.2.11 Análise estatística

Os valores de UFC/mL são extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. Assim, as contagens de microrganismos, em UFC/mL, foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$) para fins de análise estatística. Os dados foram analisados estatisticamente usando os testes de ANOVA e pós-teste de Tukey. Para o teste Alamar Blue® os resultados foram submetidos à análise de variância de 2 fatores (solução e tempo). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados são apresentados de acordo com os Estudos I e II.

5.1 Estudo I

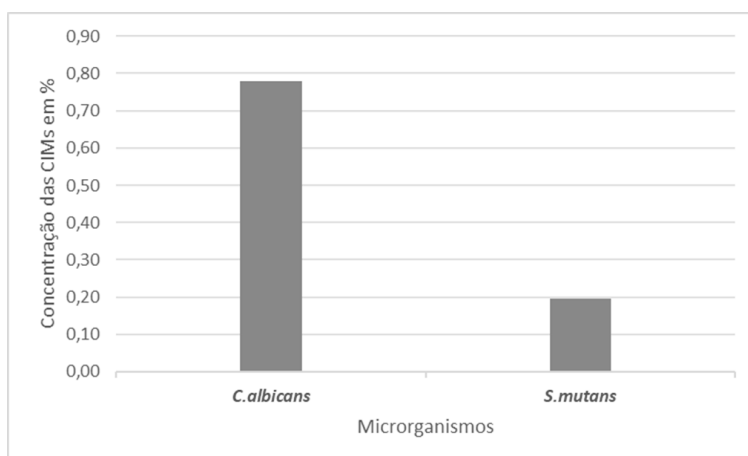
A seguir estão descritos os resultados obtidos para os protocolos de prevenção e desinfecção realizados por meio da utilização de soluções desinfetantes sobre os biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados em amostras de resinas acrílicas de base e reembasamento de próteses.

5.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da solução de Lifebuoy®

O teste para confirmação e análise de CIM foi realizado para as células planctônicas dos microrganismos *C. albicans* e *S. mutans*, em três ocasiões distintas.

Para o microrganismo *Candida albicans*, a CIM da solução do sabonete Lifebuoy® foi encontrado na diluição 7, que se encontrava a 0,78% da concentração total do sabonete. Para o microrganismo *S. mutans*, a CIM foi encontrada na diluição 9, referente a 0,195 % da concentração do sabonete. Como também utilizamos a solução para o biofilme misto (*C. albicans* e *S. mutans*), selecionamos a concentração utilizada de 0,78% para ambos os microrganismos.

Figura 3 - Resultados em porcentagem das CIMs para *C. albicans* e *S. mutans*



Fonte: Elaboração própria.

5.1.2 Capacidade de formação dos biofilmes simples e misto sobre resinas para base e reembasamento de próteses após imersão em soluções desinfetantes, como método de prevenção

A contagem de UFC/mL (em logaritmos) foi avaliada por meio de análise de variância de 3 fatores (tempo, tipo de biofilme e solução). Os resultados mostraram interação significativa ($p < 0.0001$) entre o tempo de imersão e o tipo de biofilme (simples e misto) em relação à UFC/mL de *C. albicans* sobre as amostras de resinas de base e reembasamento de próteses (Figuras de 4 a 7).

As Figuras 4 e 5 mostram os valores de viabilidade de *C. albicans*. ($\log_{10}$ UFC/mL) sobre as amostras de resina de base e reembasamento de próteses. Observa-se que, em todos os tempos, não houve diferença estatística entre os grupos hipoclorito de sódio e Lifebuoy® em relação a formação do biofilme. Além disso, esses dois grupos foram significativamente diferentes do grupo PBS, com exceção do 7º dia. Esses achados mostram a efetividade do sabonete Lifebuoy®, o qual mostrou resultados semelhantes ao grupo controle positivo (hipoclorito de sódio 0,5%).

Figura 4 - Resultados do crescimento de *C. albicans* (biofilmes simples e misto) sobre as amostras de resina para base de prótese após imersão nas diferentes soluções

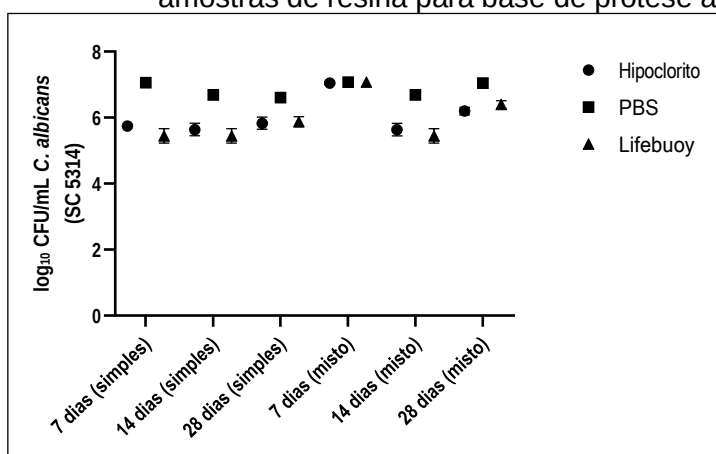


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Resultados do crescimento de *C. albicans* (biofilmes simples e misto) sobre as amostras de reembasador após imersão nas diferentes soluções

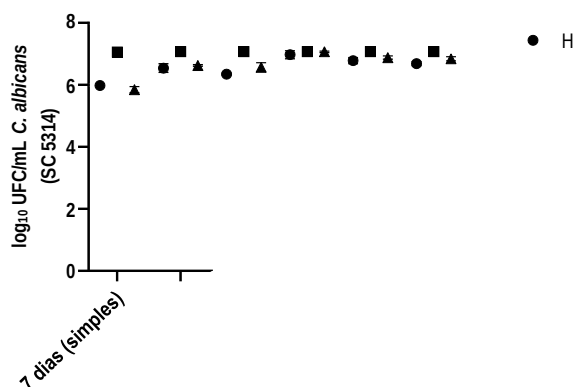


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 6 apresenta os resultados do crescimento de *S. mutans* (biofilmes simples e misto) sobre as amostras de resina para base de prótese após imersão nas diferentes soluções. Observa-se maior redução de viabilidade microbiana (*S. mutans*) para o grupo Lifebuoy® após 14 dias de imersão, independentemente do tipo de biofilme (simples ou misto). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Lifebuoy® e hipoclorito para todos os tempos, exceto para o 7° dia de imersão, para ambos os biofilmes (simples e duplo), mostrando também a efetividade do sabonete em relação a *S. mutans*.

Figura 6 - Resultados do crescimento de *S. mutans* (biofilmes simples e misto) sobre as amostras de resina para base de prótese após imersão nas diferentes soluções

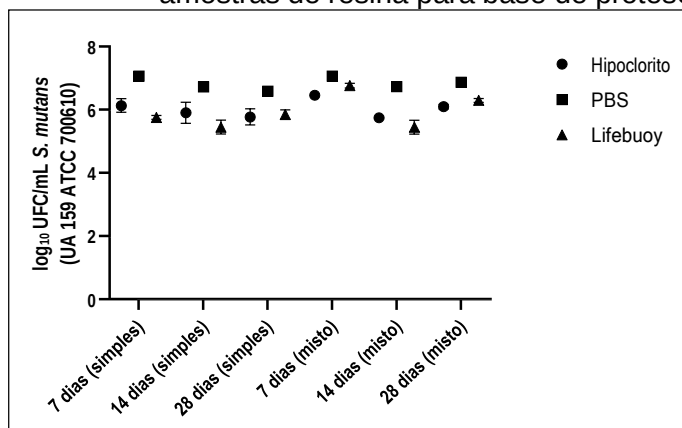


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 7 mostra os resultados do crescimento de *S. mutans* (biofilmes simples e misto) sobre as amostras de reembasador após imersão nas diferentes soluções. Pode-se observar maior redução de viabilidade microbiana para biofilme simples de *S. mutans* para o grupo hipoclorito no 28º dia de imersão, sendo esse grupo diferente estatisticamente de todos os outros grupos para todas as condições avaliadas. Para esse mesmo período de imersão foi observado diferença estatística significativa entre os grupos hipoclorito e Lifebuoy® para biofilme simples e duplo de *S. mutans*. Além disso, é importante destacar que, para a maioria dos tempos de imersão, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo PBS e Lifebuoy®, com maior redução da viabilidade celular para o grupo Lifebuoy®.

Figura 7 - Resultados do crescimento de *S. mutans* (biofilmes simples e misto) sobre as amostras de reembasador após imersão nas diferentes soluções

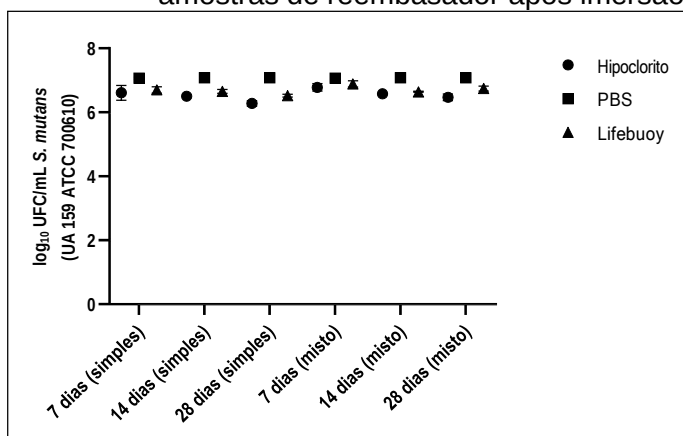


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

A capacidade de formação dos biofilmes simples e misto sobre resinas para base e reembasamento de próteses, após imersão em soluções desinfetantes, também foi avaliada por meio do teste Alamar Blue® e os resultados foram submetidos à análise de variância de 2 fatores (solução e tempo) (Figuras de 8 a 13).

A Figura 8 mostra os resultados do metabolismo celular do biofilme simples de *C. albicans* formado sobre as amostras de resina de base de prótese após imersão nas diferentes soluções. Após análise dos resultados, foi observado interação significativa entre fatores ($p < 0,0001$). Ambos os grupos, sabonete líquido Lifebuoy® e hipoclorito de sódio 0,5%, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo PBS em todos os períodos de imersão avaliados. Os grupos de sabonete após 14 e

28 dias são semelhantes estatisticamente aos grupos de hipoclorito após 7, 14 e 28 dias de imersão.

Figura 8 - Resultados do metabolismo celular do biofilme simples de *C. albicans* formado sobre as amostras de resina de base de prótese após imersão nas diferentes soluções

Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação a Figura 9, observa-se que o grupo que apresentou maior redução microbiana de *S. mutans* foi o hipoclorito em 7 dias de imersão, sendo este grupo estatisticamente diferente de todos os outros avaliados. Ainda se nota que as reduções do grupo experimental, após 14 e 28 dias, são semelhantes estatisticamente em relação ao grupo hipoclorito. Tanto o hipoclorito como o sabonete reduziram o metabolismo celular.

Figura 9 - Resultados do metabolismo celular do biofilme simples de *S. mutans* formado sobre as amostras de resina de base de prótese após imersão nas diferentes soluções

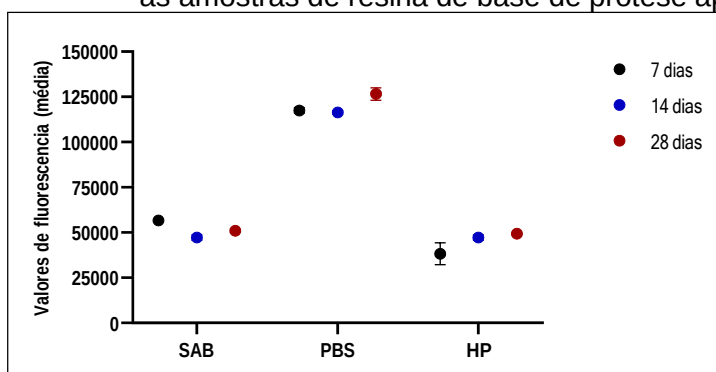


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação a Figura 10, observa-se interação significativa entre os fatores independentes ($p < 0,0001$). Essa interação é evidenciada pelos diferentes tempos de imersão no grupo PBS, na qual todos os tempos foram significantemente distintos. Também se observa que os grupos experimentais (Lifebuoy®) e controle positivo (hipoclorito de sódio 0,5%) apresentaram maiores reduções de metabolismo microbiano quando comparados ao grupo PBS.

Figura 10 - Resultados do metabolismo celular do biofilme misto formado sobre as amostras de resina de base de prótese após imersão nas diferentes soluções

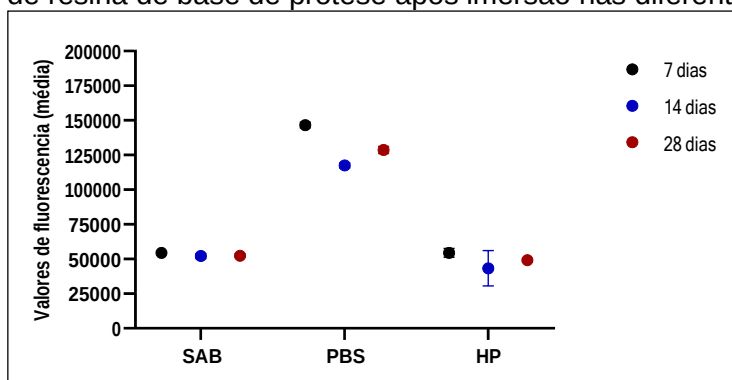


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 11 mostra os resultados do metabolismo celular do biofilme simples de *C. albicans* formado sobre as amostras de reembasador após imersão nas diferentes soluções. Interação significativa entre os fatores independentes foi observada ($p < 0,0001$). Ambos os grupos, experimental (Lifebuoy®) e controle positivo (hipoclorito de sódio 0,5%), apresentaram diferença significativa em relação ao grupo PBS em todos os períodos de imersão avaliados. Em relação ao tempo, o grupo experimental após 14 e 28 dias de imersão é semelhante, em significância estatística, ao grupo hipoclorito de sódio 0,5% após 7, 14 e 28 dias de imersão.

Figura 11 - Resultados do metabolismo celular do biofilme simples de *C. albicans* formado sobre as amostras de reembasador após imersão nas diferentes soluções

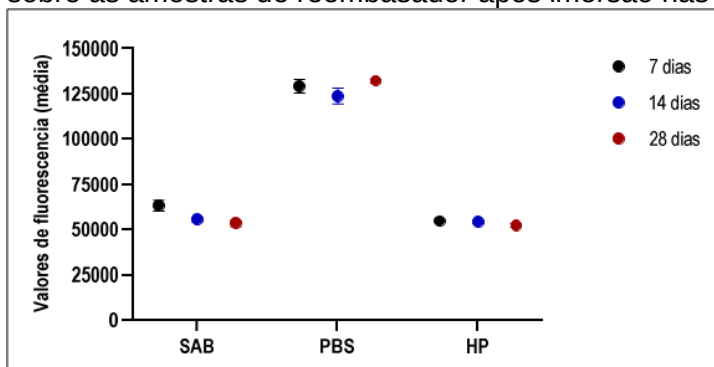


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação a Figura 12, observa-se redução significativa do metabolismo celular para os grupos experimental (Lifebuoy®) e controle positivo (hipoclorito de sódio 0,5%) em relação ao PBS. Além disso, verifica-se que os grupos não apresentaram diferença significativa em relação ao tempo de imersão.

Figura 12 - Resultados do metabolismo celular do biofilme simples de *S. mutans* formado sobre as amostras de reembasador após imersão nas diferentes soluções

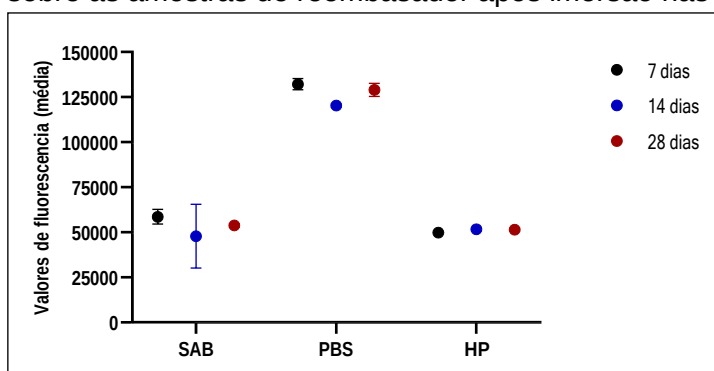


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação a figura 13, observa-se interação significativa entre os fatores independentes ($p < 0,0001$). Ambos os grupos, experimental (Lifebuoy®) e controle positivo (hipoclorito de sódio 0,5%), apresentaram diferença significativa em relação ao grupo PBS em todos os períodos de imersão avaliados. Em relação ao tempo, o grupo experimental após 14 e 28 dias é semelhante, em significância estatística, ao grupo hipoclorito de sódio 0,5% após 7, 14 e 28 dias de imersão. Essa interação

significativa também é evidenciada nos diferentes tempos de imersão no grupo PBS, no qual todos os tempos são significantemente distintos entre si.

Figura 13 - Resultados do metabolismo celular do biofilme misto formado sobre as amostras de reembasador após imersão nas diferentes soluções

Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

5.1.3 Capacidade de remoção dos biofilmes simples e misto sobre resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses após imersão em solução de sabonete líquido desinfetante, como método de desinfecção

Para a avaliação da capacidade de redução do biofilme simples de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* e do biofilme misto (*C. albicans* e *S. mutans*) as médias dos dados obtidos por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram convertidos para uma escala logarítmica de base 10 e submetidos à Anova de dois fatores (tipo de resina e solução). Em todas as análises estatísticas, houve diferença significativa entre os fatores ($p < 0,0001$). A solução do sabonete líquido Lifebuoy® reduziu a quantidade de biofilme sobre as amostras de resina de base em torno de 3 logs em relação ao controle negativo, em relação a todos os tipos de biofilme. Já para o reembasador, houve uma redução em torno de 2 logs para todos os biofilmes (Figuras de 14 a 17).

A Figura 14 apresenta os valores de UFC/mL das células de *C. albicans* (biofilme simples) formadas sobre as amostras, de ambas as resinas, e submetidas ao procedimento de desinfecção. Pode observar que o grupo controle positivo (hipoclorito de sódio 0,5%) reduziu totalmente os valores de UFC/mL de *C. albicans*.

Além disso, o grupo Lifebuoy® (também para ambas as resinas) apresentou-se diferente estatisticamente do grupo PBS, mostrando a efetividade da solução experimental.

Figura 14 - Valores de UFC/mL das células de *C. albicans* (biofilme simples) formadas sobre as amostras (resina de base e reembasador) e submetidas ao procedimento de desinfecção

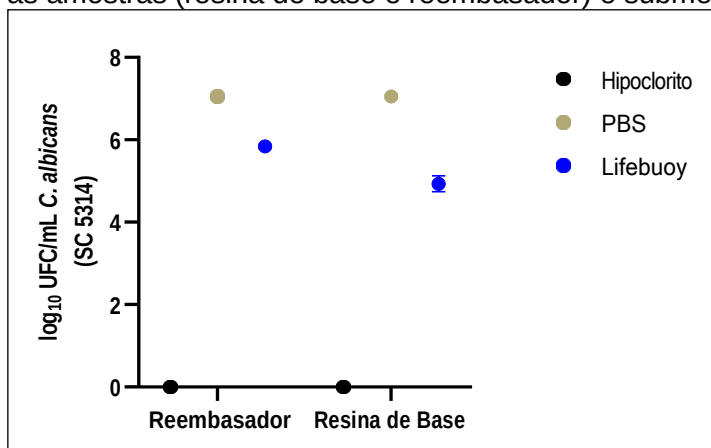


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação ao biofilme simples de *S. mutans* (Figura 15), observa-se que o grupo controle positivo (hipoclorito de sódio 0,5%) reduziu totalmente os valores de UFC/mL de *S. mutans*. Além disso, o grupo Lifebuoy® apresentou-se diferente estatisticamente do grupo PBS, mostrando sua efetividade como agente de desinfecção. A redução foi maior na resina de base de prótese.

Figura 15 - Valores de UFC/mL das células de *S. mutans* (biofilme simples) formadas sobre as amostras (resina de base e reembasador) e submetidas ao procedimento de desinfecção

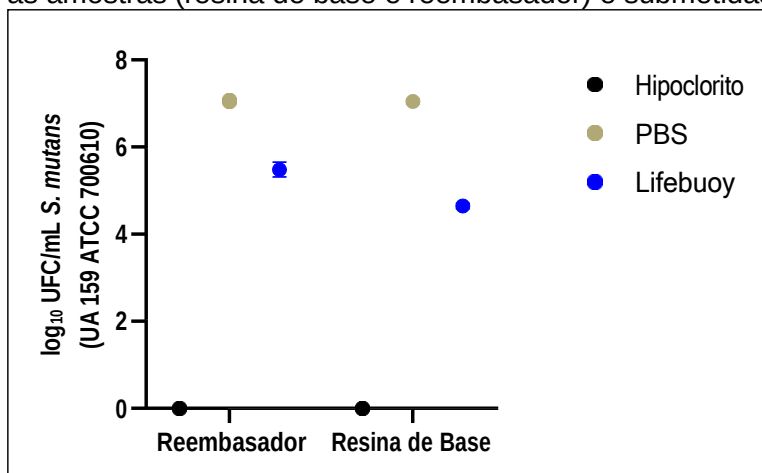


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação a *C. albicans*, em biofilme misto (Figura 16), observa-se que, semelhante aos demais tipos de biofilme, o grupo hipoclorito de sódio 0,5% reduziu totalmente os valores de UFC/mL. Além disso, o grupo Lifebuoy® apresentou-se diferente estatisticamente do grupo PBS em ambas as resinas. Também a redução foi maior para o biofilme formado sobre as amostras de resina de base.

Figura 16 - Valores de UFC/mL das células de *C. albicans*, em biofilme misto, formadas sobre as amostras (resina de base e reembasador) e submetidas ao procedimento de desinfecção

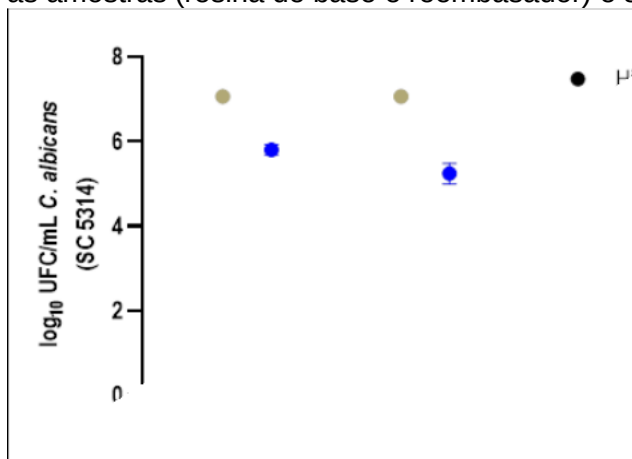


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 17 apresenta os valores de UFC/mL das células de *S. mutans*, em biofilme misto, formadas sobre as amostras (resina de base e reembasador) e submetidas ao procedimento de desinfecção. Os mesmos resultados descritos para *C. albicans* em biofilme misto foram observados para *S. mutans*. Assim, o grupo hipoclorito de sódio 0,5% reduziu totalmente os valores de UFC/mL. Além disso, o grupo Lifebuoy® apresentou-se diferente estatisticamente do grupo PBS em ambas as resinas. Também a redução foi maior para o biofilme formado sobre as amostras de resina de base.

Figura 17 - Valores de UFC/mL das células de *S. mutans*, em biofilme misto, formadas sobre as amostras (resina de base e reembasador) e submetidas ao procedimento de desinfecção

Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

A capacidade de desinfecção dos biofilmes simples e misto sobre resinas para base e reembasamento de próteses também foi avaliada por meio do teste Alamar Blue® e os resultados foram submetidos à análise de variância one way (Figuras de 18 a 23). As Figuras de 18 a 20 mostram os resultados do metabolismo celular dos biofilmes simples de *C. albicans*, *S. mutans* e biofilme misto, respectivamente, formados sobre as amostras de resina de base de prótese após o protocolo de desinfecção. Após análise dos resultados, foi observado interação significativa entre fatores ($p < 0,0001$). Ambos os grupos, sabonete líquido Lifebuoy® e Hipoclorito de sódio 0,5%, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo PBS.

Figura 18 - Valores do metabolismo celular do biofilme simples de *C. albicans*, formado sobre amostras de resina de base de prótese submetidas ao procedimento de desinfecção

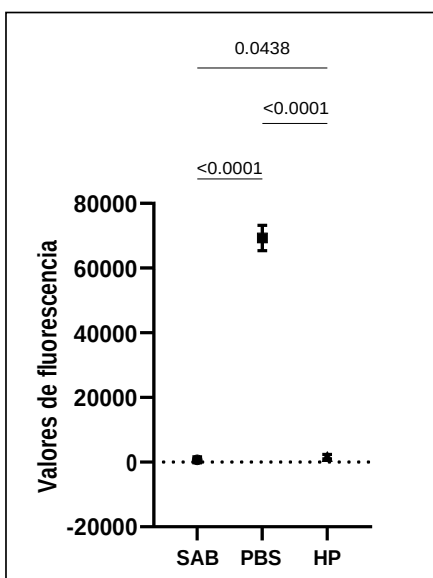


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 19 - Valores do metabolismo celular do biofilme simples de *S. mutans*, formado sobre amostras de resina de base de prótese submetidas ao procedimento de desinfecção

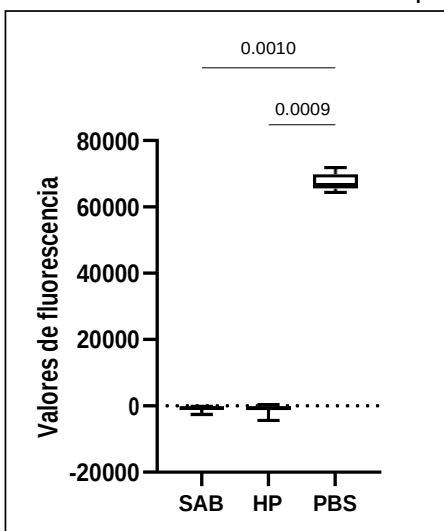


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 - Valores do metabolismo celular do biofilme misto, formado sobre amostras de resina de base de prótese submetidas ao procedimento de desinfecção

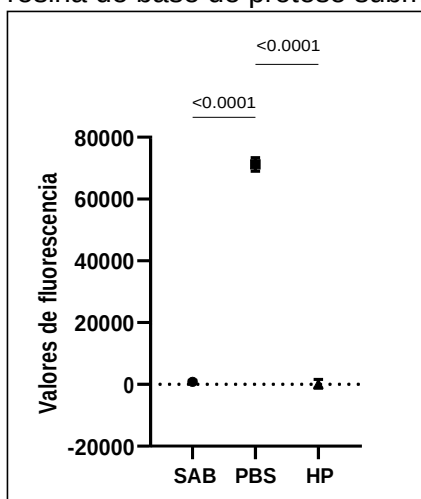


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

As Figuras de 21 a 23 mostram os resultados do metabolismo celular dos biofilmes simples de *C. albicans*, *S. mutans* e biofilme misto, respectivamente, formados sobre as amostras de reembasador de prótese após o protocolo de desinfecção. Após análise dos resultados, foi observado interação significativa entre fatores ($p < 0,0001$). Ambos os grupos, sabonete líquido Lifebuoy® e Hipoclorito, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo PBS.

Figura 21 - Valores do metabolismo celular do biofilme de *C. albicans*, formados sobre amostras de reembasador de prótese submetidas ao procedimento de desinfecção

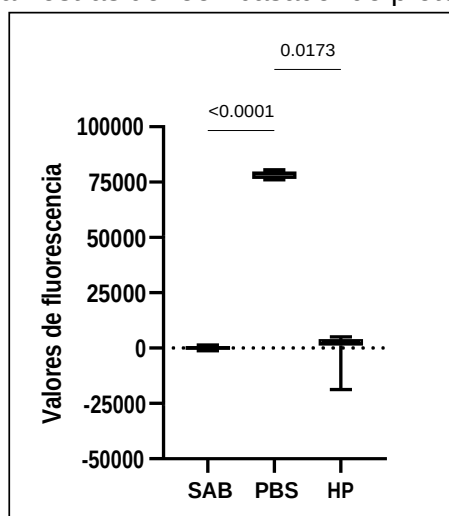


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 22 - Valores do metabolismo celular do biofilme de *S. mutans*, formados sobre amostras de reembasador de prótese submetidas ao procedimento de desinfecção

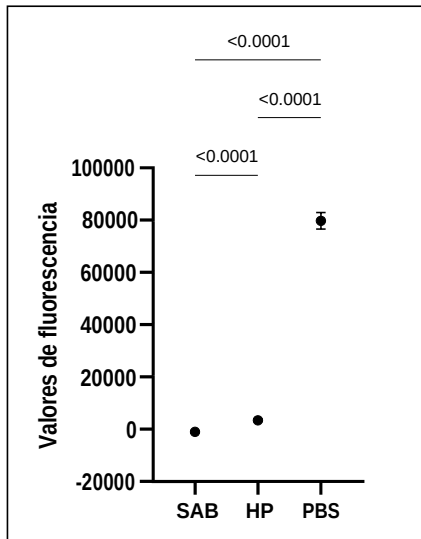


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 - Valores do metabolismo celular do biofilme misto, formados sobre amostras de reembasador de prótese submetidas ao procedimento de desinfecção

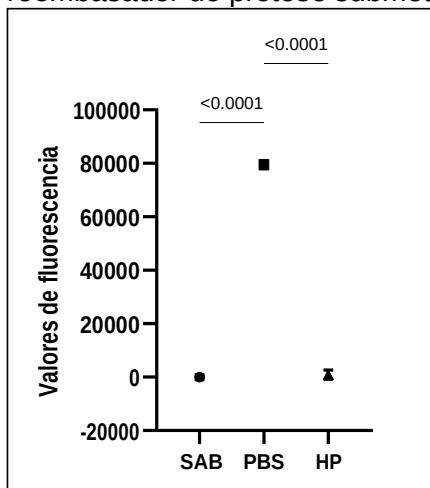


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Estudo II

Os resultados obtidos após utilização de protocolo de tratamento com extrato de *Cryptocarya moschatta* sobre os biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre amostras de resina de base e reembasadora de prótese estão decritos a seguir.

5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para as células planctônicas

Os testes para análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para as células planctônicas foram realizados em três ocasiões distintas. Para *C. moschatta*, foi encontrado como resultado o mesmo valor de CIM e CFM, sendo este na diluição de 0,003 g/mL. A CIM é a concentração que inibiu o crescimento das células planctônicas e a CFM é a concentração que eliminou 100% das células planctônicas.

5.2.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima das células em biofilme (CFMb)

A Concentração Fungicida Mínima das células em biofilme de *C. albicans* (CFMb) foi igual a 0,045 g/mL. Essa concentração, após 2 horas de contato com o biofilme formado sobre o fundo de poços de uma placa de 24 orifícios, inibiu completamente o crescimento celular, para os extratos de folhas e frutos das espécies de *Cryptocarya moschatta*. Para as células de *S. mutans* esse valor foi o de 0,030 g/mL. Uma vez que a solução foi utilizada também para o biofilme misto, a concentração selecionada foi de 0.045g/mL.

5.2.3 Contagem do número de Unidade Formadoras de Colônias (UFC/mL)

O número de UFC/mL dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans*, formados sobre as amostras de resinas de base e reembasamento de próteses, foi avaliado nas concentrações equivalentes a 0,045 g/mL de *C. moschatta*.

Foi usado também substâncias para controle positivo, solução de nistatina a 100,000 IU/mL, para os biofilmes de *C. albicans*, e solução de antibiótico para os biofilmes de *S. mutans*. Como controle negativo, foi utilizado solução de PBS.

A Figura 24 apresenta os valores de UFC/mL das células de *C. albicans*, em biofilme simples e misto, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL, sobre amostras de resina de base de prótese. Observa-se interação significativa entre os fatores independentes ($p < 0,0001$). Os grupos nistatina e extrato foram estatisticamente diferentes do grupo PBS. O extrato reduziu a tanto para o biofilme simples quanto para o biofilme misto ($p < 0,05$), mostrando a efetividade do protocolo de tratamento com *Cryptocarya moschatta*.

Figura 24 - Valores de UFC/mL das células de *C. albicans*, em biofilme simples e misto, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045g/mL sobre amostras de resina de base de prótese

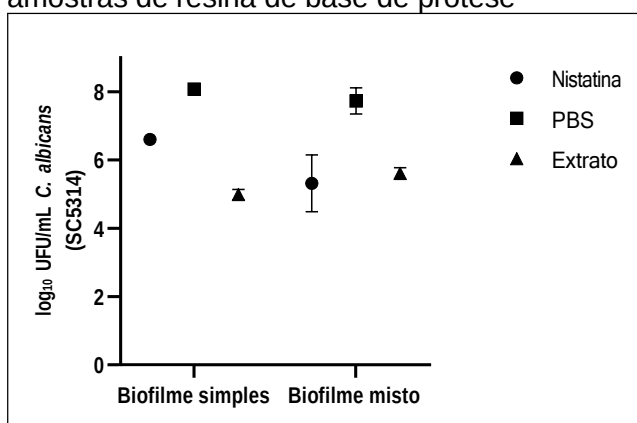


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 25, a qual mostra os valores de UFC/mL das células de *S. mutans*, em biofilme simples e misto, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL sobre amostras de resina de base de prótese, observa-se interação significativa entre os fatores independentes ($p < 0,0001$). Os maiores valores de redução microbiana foram encontrados para os biofilmes simples e misto de *S. mutans* tratados com extrato. Além disso todos os grupos avaliados são diferentes estatisticamente entre si.

Figura 25 - Valores de UFC/mL das células de *S. mutans*, em biofilme simples e misto, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL sobre amostras de resina de base de prótese

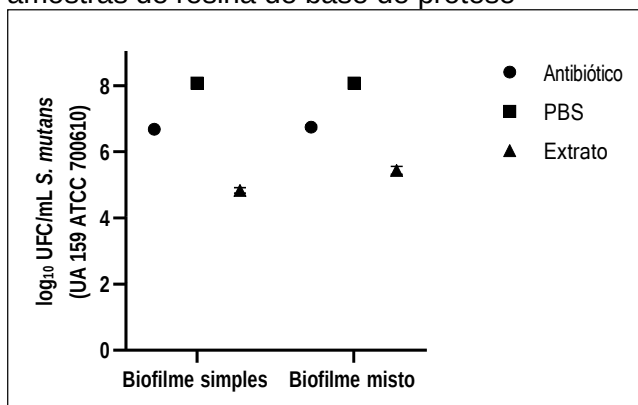


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 26 apresenta os valores de UFC/mL das células de *C. albicans*, em biofilme simples e misto, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL sobre amostras de reembasador. Da mesma forma que ocorreu para a resina de base, observa-se interação significativa entre os fatores independentes ($p < 0,0001$). Os maiores valores de redução microbiana foram encontrados para os grupos extratos tanto para o biofilme simples e misto (não houve significância estatística entre ambos). Além disso, o grupo de extrato foi diferente estatisticamente dos grupos nistatina e PBS, para ambas as condições de formação de biofilme (simples e misto).

Figura 26 - Valores de UFC/mL das células de *C. albicans*, em biofilme simples e misto, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL sobre amostras de reembasador

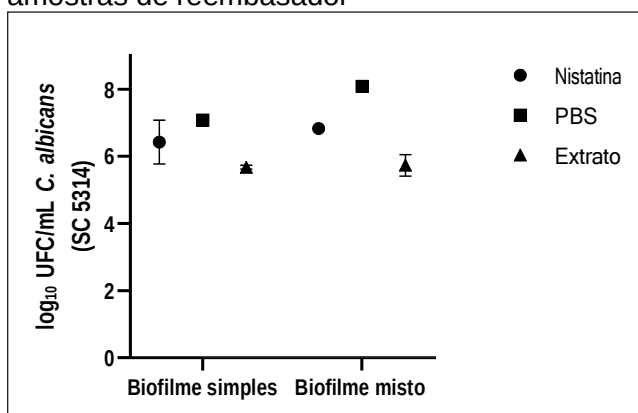


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 27, a qual mostra os valores de UFC/mL das células de *S. mutans*, em biofilme simples e misto, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL sobre amostras de reembasador, observa-se interação significativa entre os fatores independentes ($p < 0,0001$). Semelhante à resina de base, o grupo extrato reduziu significativamente a viabilidade microbiana de ambos os biofilmes (simples e misto), em comparação ao grupo PBS ($p < 0,05$).

Figura 27 - Valores de UFC/mL das células de *S. mutans*, em biofilme simples e misto, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL sobre amostras de reembasador

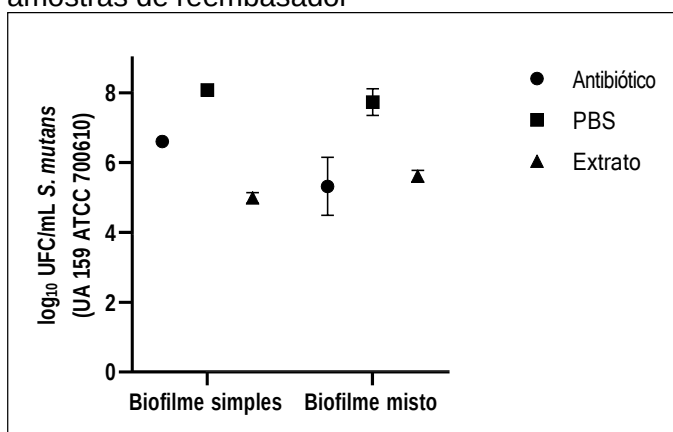


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

O protocolo de tratamento com extrato de *C. moschata* sobre os biofilmes simples e misto formados em resinas para base e reembasamento de próteses também foi avaliado por meio do teste Alamar Blue® e os resultados foram submetidos à análise de variância one way (Figuras de 28 a 33).

As Figuras de 28 a 30 mostram os resultados do metabolismo celular dos biofilmes simples de *C. albicans*, *S. mutans* e biofilme misto, respectivamente, formados sobre as amostras de resina de base de prótese, após o protocolo de tratamento. Após análise dos resultados, foi observado interação significativa entre fatores ($p < 0,0001$). Os grupos extrato de *C. moschata*, Nistatina, e antibiótico apresentaram diferença significativa em relação ao grupo PBS.

Figura 28 - Valores de UFC/mL das células de biofilme de *C. albicans*, formadas em amostras de resina de base, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL

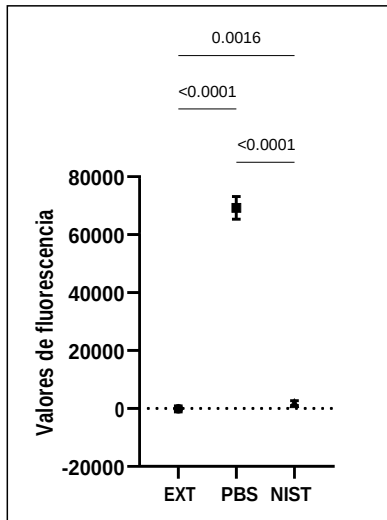


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 29 - Valores de UFC/mL das células de biofilme de *S. mutans*, formadas em amostras de resina de base, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL

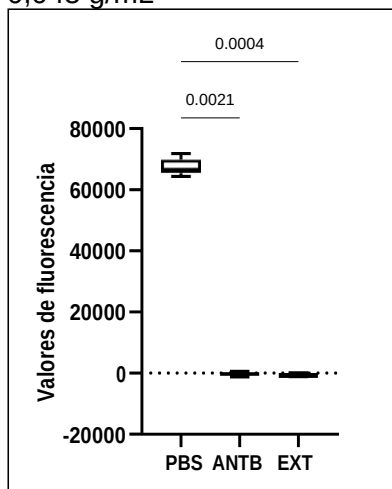


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 30 - Valores de UFC/mL das células de biofilme misto, formadas em amostras de resina de base, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL

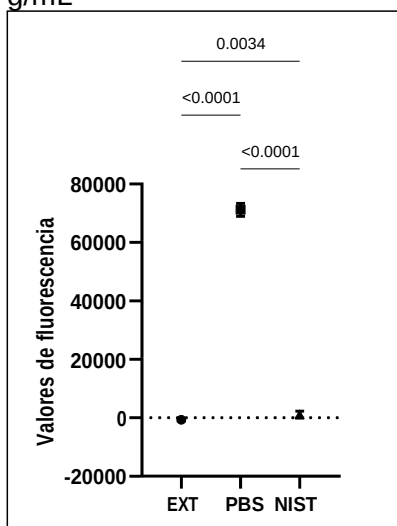


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

As Figuras de 31 a 33 mostram os resultados do metabolismo celular dos biofilmes simples de *C. albicans*, *S. mutans* e biofilme misto, respectivamente, formados sobre as amostras de reembasador de prótese após o protocolo de tratamento. Após análise dos resultados, foi observado interação significativa entre fatores ($p < 0,0001$). Da mesma forma que para a resina de base, os grupos, extrato de *C. moschata*, Nistatina, e antibiótico apresentaram diferença significativa em relação ao grupo PBS.

Figura 31 - Valores de UFC/mL das células de biofilme de *C. albicans*, formadas em amostras de reembasador, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045g/mL

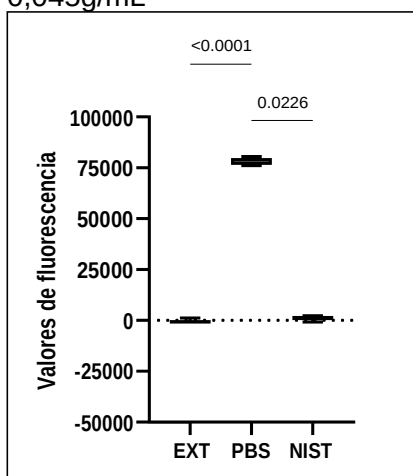


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 32 - Valores de UFC/mL das células de biofilme de *S. mutans*, formadas em amostras de reembasador, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045g/mL

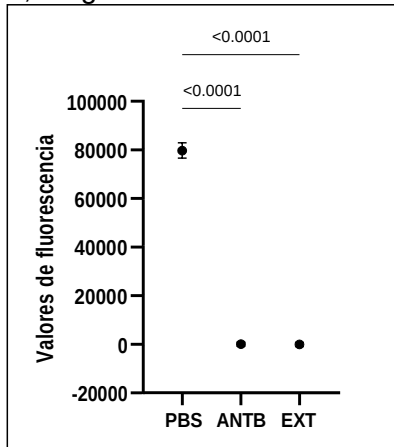


Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 33 - Valores de UFC/mL das células de biofilme misto, formadas em amostras de reembasador, submetidas ao tratamento com extrato de *Cryptocarya* na concentração 0,045g/mL

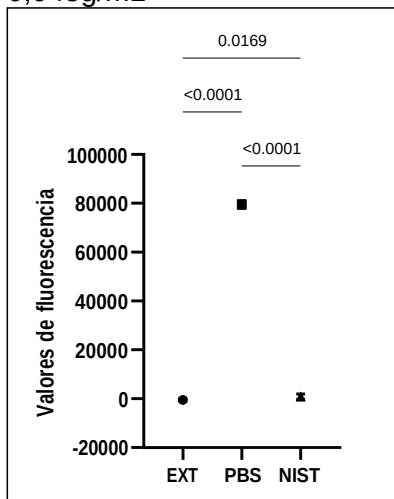


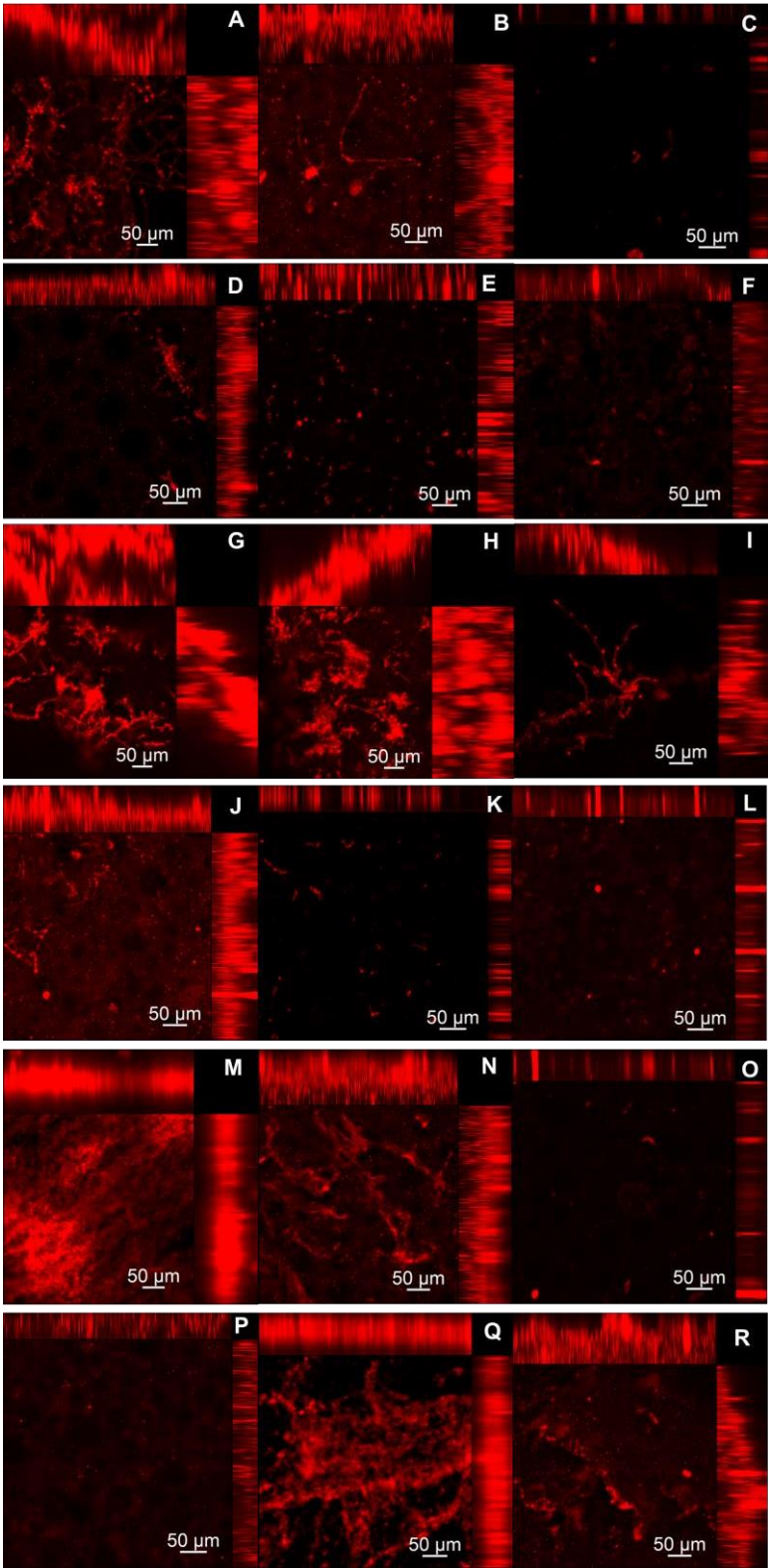
Gráfico de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.4 Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal

Os danos dos componentes da matriz extracelular dos biofilmes foram avaliados após os tratamentos. A matriz polimérica extracelular representa aproximadamente 90% da biomassa total do biofilme e pode atuar como uma barreira física de proteção para as células. Sua espessura e composição química podem impedir a difusão de antimicrobianos nas camadas mais profundas dos biofilmes, tornando essas células tolerantes aos tratamentos^{108,109}. Os componentes visualizados em vermelho foram marcados com Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain. Essa sonda fluorescente tem sido utilizada para corar os componentes proteicos da matriz de biofilmes¹¹⁰. Este corante marca a maioria das classes de proteínas, incluindo glicoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, proteínas de ligação de cálcio, proteínas fibrilares e outras proteínas, que são difíceis de corar. Nesse estudo, utilizou-se esse marcador a fim de avaliar se os componentes proteicos da matriz polimérica extracelular dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* sofreriam danos após os tratamentos com extrato de *C. moschatta*. A partir da aquisição das imagens (Figura 34), foi possível verificar que houve uma menor detecção de fluorescência nos grupos tratados com extrato em comparação com os grupos controles negativos de PBS. O resultado foi observado tanto para as amostras de resina de base de prótese quanto para as amostras de reembasador.

Figura 34 - Avaliação do dano nos componentes proteicos da matriz extracelular do biofilme após os tratamentos. Componentes visualizados em vermelho foram marcados com Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain.



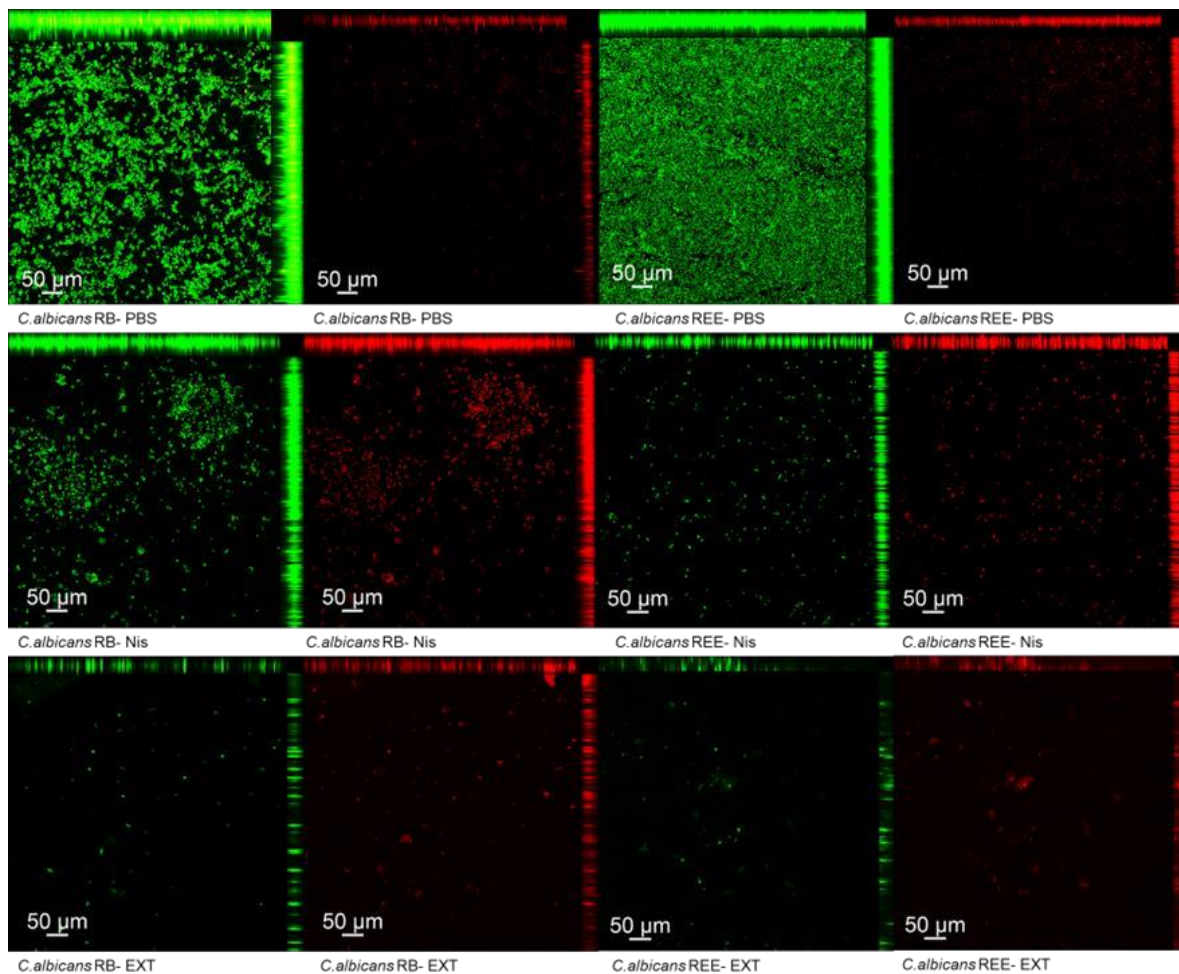
Legenda: **A:** Biofilme de *C. albicans* em amostra de Resina de Base de prótese - Controle Negativo; **B:** Biofilme de *C. albicans* em amostra de Resina Reembasadora prótese - Controle Negativo; **C:** Biofilme de *C. albicans* em amostra de Resina de Base de prótese - Solução de Extrato de *C. moschatta*; **D:** Biofilme de *C. albicans* em amostra de Resina Reembasadora de prótese - Solução de Extrato de *C. moschatta*; **E:** Biofilme de *C. albicans* em amostra de Resina de Base de prótese - Controle Positivo; **F:** Biofilme de *C. albicans* em amostra de Resina Reembasadora - Controle Positivo; **G:** Biofilme misto em amostra de Resina de Base de prótese - Controle Negativo; **H:** Biofilme misto em amostra de Resina Reembasadora de prótese - Controle Negativo; **I:** Biofilme misto em amostra de Resina de Base de prótese - Solução de Extrato de *C. moschatta*; **J:** Biofilme misto em amostra de Resina Reembasadora de prótese - Solução de Extrato de *C. moschatta*; **K:** Biofilme misto em amostra de Resina de Base de prótese - Controle Positivo; **L:** Biofilme misto em amostra de Resina de Reembasadora de prótese - Controle Positivo; **M:** Biofilme de *S. mutans* em amostra de Resina de Base de prótese - Controle Negativo; **N:** Biofilme de *S. mutans* em amostra de Resina Reembasadora prótese - Controle Negativo; **O:** Biofilme de *S. mutans* em amostra de Resina de Base de prótese - Solução de Extrato de *C. moschatta*; **P:** Biofilme de *S. mutans* em amostra de Resina Reembasadora de prótese - Solução de Extrato de *C. moschatta*; **Q:** Biofilme de *S. mutans* em amostra de Resina de Base de prótese - Controle Positivo; **R:** Biofilme de *S. mutans* em amostra de Resina Reembasadora - Controle Positivo.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

5.2.5 Avaliação da viabilidade celular por meio de Microscopia de Varredura Confocal a Laser (MVCL)

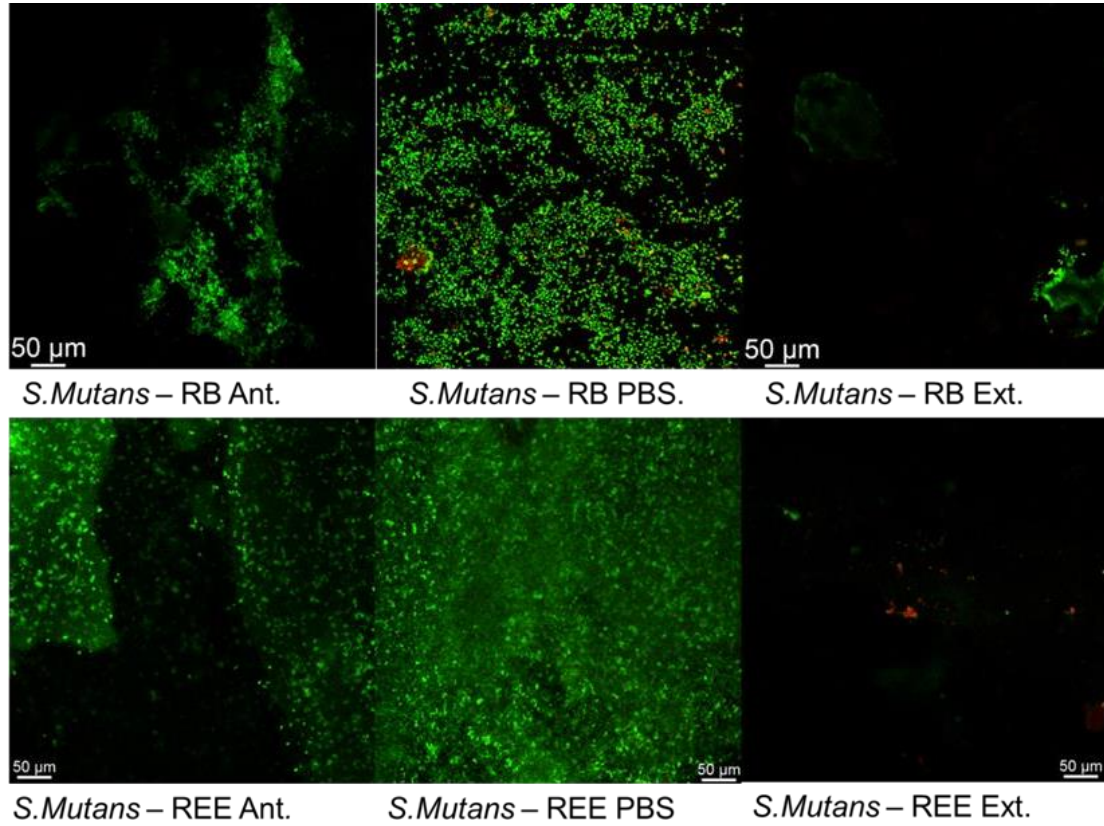
As Figuras 35, 36 e 37 mostram as imagens dos biofilmes simples de *C. albicans*, *S. mutans* e misto, respectivamente, formados sobre corpos de prova de resina acrílica para base de próteses (RB) e reembasadores (REE), após diferentes tratamentos, conforme os grupos experimentais. A fim de verificarmos a viabilidade dos biofilmes formados in vitro, as amostras, após os tratamentos, foram marcadas com syto-9 e iodeto de propídio (PI) e foram analisadas por meio da Microscopia de Fluorescência Confocal. O syto-9 (marcador de fluorescência verde) é um corante que permeia todas as células presentes no biofilme e o PI (marcador de fluorescência vermelha) é um corante que marca o DNA apenas das células mortas. Desta forma, a prevalência da relação verde/vermelho indica a viabilidade desta cultura, ou seja, quanto maior a prevalência de marcação em verde e menor em vermelho, maior é a predominância de células vivas compondo o biofilme¹¹¹. Independentemente do tipo de biofilme, podemos observar que o grupo controle apresentou maior espessura do biofilme quando comparado com os demais grupos. Nos grupos controles de PBS podemos observar que quase não há células coradas em vermelho, mostrando que as células dos microrganismos continuaram vivas. No grupo controle positivo de Nistatina foi possível observar redução de espessura e de células viáveis, muito semelhante ao que ocorreu com os grupos de extrato de *C. moschatta*. Esses resultados foram semelhantes aos observados por meio da contagem de UFC/mL.

Figura 35 - Viabilidade celular dos biofilmes de *C. albicans* analisados por microscopia de fluorescência confocal. Amostras marcadas com Syto-9 (células marcadas em verde) e iodeto de propídio (células marcadas em vermelho)



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 36 - Viabilidade celular dos biofilmes de *S. mutans* analisados por microscopia de fluorescência confocal. Amostras marcadas com Syto-9 (células marcadas em verde) e iodeto de propídio (células marcadas em vermelho)



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 37 - Viabilidade celular dos biofilmes mistos analisados por microscopia de fluorescência confocal. Amostras marcadas com Syto-9 (células marcadas em verde) e iodeto de propídio (células marcadas em vermelho)

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

6 DISCUSSÃO

A estomatite protética é considerada uma doença multifatorial associada a vários fatores incluindo o uso de prótese dentária, infecção fúngica/bacteriana da mucosa e higiene deficiente das próteses^{112,113}. Sendo assim, a limpeza das próteses é uma das abordagens mais importantes para a prevenção da doença. A limpeza das próteses deve ser rápida, eficaz e fácil de ser realizada pelos pacientes e/ou seus cuidadores. Quando são realizadas de forma inadequada, pode não ser suficiente para controlar o crescimento de fungos e bactérias, os quais facilmente se aderem à estrutura interna da base de prótese¹¹⁴. Existem várias maneiras de se realizar a limpeza de próteses removíveis, sendo elas de forma mecânica, química ou através de uma combinação de ambas, que se mostra eficaz e recomendado para o controle dos biofilmes¹¹⁵.

Com relação ao método mecânico de higienização, a abordagem mais comum entre usuários de próteses é composta pela escovação com dentífrico⁴². No entanto, a remoção eficaz do biofilme pela escovação exige um certo grau de destreza manual, que é comumente comprometida em idosos¹¹⁶. Outra desvantagem é que a ação abrasiva das cerdas pode resultar no desgaste da base da prótese e dos materiais de revestimento¹¹⁷. E ainda, o uso de dentífrico pode arranhar e causar irregularidades na superfície das próteses, o que facilita ainda mais a aderência e crescimento dos microrganismos¹¹⁸.

Em relação ao método químico de higienização das próteses, a solução considerada padrão ouro na literatura é o hipoclorito de sódio, que inativa o biofilme microbiano e inibe a formação de cálculo^{60,119}. Apesar de apresentar bons resultados na capacidade antimicrobiana, sabe-se que em concentrações maiores que 1% pode causar efeitos citotóxicos moderados aos tecidos bucais, além de promover branqueamento das bases acrílicas e corrosão dos componentes metálicos das próteses^{48,51}. Outras desvantagens verificadas com o uso da imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% em resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses foram de alterações na topografia da superfície, para uso prolongado do produto (6 meses)¹²⁰, alterações na cor, aumento da rugosidade da superfície e efeitos adversos na pele e nos olhos¹²¹.

Levando estes pontos em consideração, este estudo buscou testar uma solução de sabonete líquido desinfetante Lifebuoy® para substituir o hipoclorito de sódio na prevenção e desinfecção de biofilmes formados em próteses dentárias, que possua a mesma eficácia sem as desvantagens associadas à utilização do produto.

Para que possamos propor protocolos efetivos no tratamento e prevenção da estomatite protética é fundamental que haja a compreensão das espécies microbianas patogênicas envolvidas na formação do biofilme¹²². De acordo com a literatura, indentificou-se que tanto a bactéria *S. mutans* como o fungo *C. albicans* possuem um papel relevante na formação do biofilme na parte interna das próteses^{70,71}. E ainda, verificou-se que o *S. mutans* é um importante precursor da formação de biofilme e, em associação com *C. albicans*, pode causar estomatite protética mais virulenta²⁶. O *S. mutans* pode se aderir facilmente às hifas de *C. albicans*, e as duas espécies podem crescer sinergicamente no biofilme, aumentando sua espessura, o que causa maiores danos e dificultando sua remoção ou a penetração de medicamentos^{123,124,125}. Sendo assim, este trabalho se propôs a analisar a eficácia da solução do Lifebouy na prevenção e deseinfecção de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre resinas de base e reembasadoras de próteses.

No protocolo de prevenção, no qual as amostras são imersas nas soluções antes da formação do biofilme, observou-se que, para todos os tempos de imersão, não houve diferença estatística entre os grupos hipoclorito de sódio e Lifebuoy® em relação à formação do biofilme. Além disso, esses dois grupos foram significativamente diferentes do grupo PBS (controle negativo), mostrando a efetividade do sabonete Lifebuoy® contra a formação de biofilme e na redução dos microrganismos de forma equivalente ao hipoclorito a 0,5%. Esses resultados foram observados para todos os tipos de biofilme e para ambas as resinas (resina de base e reembasador). Apesar da diferença estatística encontrada entre os grupos experimentais e controle, foi observado crescimento de biofilme me todos os grupos. Este resultado referente à prevenção foi compatível com outros trabalhos já publicados, como o de Zoccolotti et al.⁵⁴, que conduziram um estudo in vitro investigando a capacidade de formação de biofilme de *C. albicans* sobre amostras de resina de base para prótese através da imersão em soluções dos sabonetes líquidos antimicrobianos mais encontrados em farmácias e mercados: Protex, Lifebuoy® e Dettol. Nos resultados de Zoccolotti et al⁵⁴., no protocolo de prevenção, foi observado

também crescimento do biofilme sobre as amostras de resina para base de prótese. Em ambos os estudos, as amostras permaneceram imersas nas soluções desinfetantes por um período de 8 horas, simulando o protocolo *overnight*, o qual é recomendado por apresentar resultados mais efetivos quando comparados com períodos mais curtos de imersão e por incentivar a remoção noturna das próteses^{60,126}. Importante destacar que nenhum estudo foi encontrado na literatura em relação aos biofilmes simples de *S. mutans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans* utilizando o protocolo de prevenção com a solução de sabonete líquido Lifebuoy®, impossibilitando a comparação com outros resultados e destacando a importância do presente estudo.

A redução da formação do biofilme sobre as amostras imersas em soluções desinfetantes foi observada para ambos os ensaios, contagem de unidades formadoras de colônias e teste Alamar Blue®. Isso significa que as soluções desinfetantes promoveram, além da inibição da proliferação celular, redução do seu metabolismo.

Em relação ao protocolo de desinfecção das amostras de resina de base e reembasador de prótese, após as formações dos biofilmes, foi possível observar diminuição das unidades formadoras de colônias nos grupos experimentais comparados com o grupo controle negativo (PBS). Para as amostras de resina de base de prótese, para todos os tipos de biofilme, houve diminuição média de 3 logs em relação ao grupo controle, enquanto para as amostras de reembasador essa redução foi em torno de 2 logs. Esses resultados também corroboram com o estudo de Zoccolotti et al.⁵⁴ (2018), que verificou que a solução de Lifebuoy® foi capaz de reduzir o biofilme simples de *C. albicans* formado sobre os corpos de prova de resina de base após 8 horas de imersão. Outros estudos que reforçam os resultados obtidos, são os de Tasso et al.⁵⁶ (2020), que verificou em um estudo clínico a eficácia da solução de sabonete Lifebuoy® na desinfecção do biofilme de espécies de *Candida* em próteses removíveis totais, e de Ribas et al.^{127,128} (2022), no qual afirmam uma redução estatisticamente significativa no biofilme de *C. albicans*, formados tanto em resinas de base quanto em reembasadores, através de escovação e imersão com solução do sabonete. Com relação aos resultados sobre as amostras confeccionadas com material reembasador rígido, estes são compatíveis com o trabalho publicado por Malavolta et al.⁵⁷ (2021), que concluíram que a solução do sabonete líquido Lifebuoy®

foi capaz de reduzir a quantidade de biofilme de *C. albicans* sobre as amostras, em torno de um log em relação ao controle negativo.

Da mesma forma que para o protocolo de prevenção, nenhum estudo foi encontrado na literatura em relação aos biofilmes simples de *S. mutans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans* utilizando o protocolo de desinfecção com a solução de sabonete líquido Lifebuoy®, impossibilitando a comparação com outros resultados e destacando a importância do presente estudo.

Como controle positivo, o hipoclorito de sódio 0,5% foi testado no presente estudo. Assim como em outros estudos já realizados^{97,129,130}, foi verificada eficácia dessa solução na eliminação de microrganismos como *C. albicans* e *S. mutans* tanto nas resinas de base quanto em reembasadores. Comparativamente, observou-se que o sabonete Lifebuoy® também apresentou redução significativamente considerável dos biofilmes em relação ao grupo controle, o que aponta este produto de desinfecção como uma alternativa ao hipoclorito de sódio. A capacidade de desinfecção do sabonete líquido Lifebuoy® pode ser explicada pela sua composição. Dentre os princípios ativos estão: EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético), cocamidopropil betaína, hidróxido de sódio, ácido cítrico e triclocarban (que possui mecanismos de ação muito semelhantes ao triclosan), curcumina, entre outros. No entanto, o fabricante não menciona as concentrações de cada componente, o que dificulta a clareza dos resultados obtidos. Devine et al.¹³¹ (2007), realizaram um estudo no qual investigou a efetividade do EDTA tetrassódico, um dos compostos do Lifebuoy®, para desinfetar produtos odontológicos que sofrem contaminação, como material de base de prótese e escovas de dente. Os efeitos sobre as espécies de *Candida* foram avaliados devido ao papel desses organismos nas infecções associadas à prótese. Após tratamento com duração de 16h, o EDTA tetrassódico reduziu as contagens viáveis de bactérias salivares e de biofilme de *C. albicans* presentes nas cerdas das escovas de dente em mais de 99% e removeu a maioria ou todos os biofilmes da superfície do material.

Embora tanto a desinfecção quanto a prevenção da formação dos biofilmes nas resinas de base ou reembasadores sejam fundamentais para impedir o desenvolvimento da estomatite protética, é fundamental que novas formas de tratamento da doença sejam estudadas. À medida que a população envelhece, cada vez mais pacientes apresentam condições médicas mais complexas, fazendo uso de

várias classes medicamentosas que podem dificultar o tratamento de certas doenças. Geralmente, os medicamentos usados para o tratamento da estomatite protética são de longa duração e podem causar diversos efeitos colaterais para pacientes com a saúde debilitada. A partir disso, terapias alternativas para o tratamento da estomatite protética, como a fitoterapia, são cada vez mais exploradas²⁹.

Recentemente, observou-se na literatura que espécies de *Cryptocarya* apresentam propriedades antifúngicas, indicando seu potencial no tratamento da estomatite protética. A *Cryptocarya* é um gênero de 350 plantas perenes pertencentes à família *Lauraceae* e é amplamente distribuído nos trópicos e subtropicais, exceto na África central. Esse gênero é conhecido por conter diversos metabólitos secundários, como alcaloides, α -pironas e flavonoides, os quais apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante e anticâncer¹³². Com base nisso, esse estudo também se propôs a testar o extrato de *Cryptocarya moschatta* como um método de tratamento para a estomatite protética. Vale ressaltar que extratos naturais brutos são, normalmente, misturas complexas constituídas por diversas classes de produtos naturais e que contêm diferentes grupos funcionais¹³³.

Os resultados obtidos a partir do teste de unidade formadoras de colônias realizadas após o tratamento com *C. moschatta*, mostraram que, para amostras de resina de base de prótese, houve uma redução de aproximadamente 4 logs em comparação com o grupo sem tratamento para o biofilme simples de *C. albicans*, comprovando grande eficácia. Em contrapartida, para o biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*, os resultados mostraram uma redução por volta de 2 logs em relação ao grupo sem tratamento. Esta menor efetividade do tratamento para o biofilme misto pode ser explicada em função da sua formação. A matriz extracelular secretada pelo biofilme misto oferece maior estabilidade mecânica para a comunidade microbiana, o que impede tanto o contato direto dos agentes antimicrobianos, fagócitos e anticorpos⁴⁰.

Com relação ao biofilme simples de *S. mutans*, foi observado uma redução de aproximadamente 2 logs em relação ao grupo sem tratamento. A menor efetividade do tratamento nas bactérias em relação aos fungos também pode ser explicada em função do processo de formação do biofilme. Estudos relatam que *S. mutans* são colonizadores precoces e que se ligam à película salivar que reveste a prótese dentária. Posteriormente ocorre a ligação de outros microrganismos, como *C.*

albicans, para a formação do biofilme oral. Analisando-se a formação dos biofilmes em ambientes orais, é possível observar que *S. mutans* se adere à superfície da prótese ficando mais internamente no biofilme em comparação com as células de *C. albicans*, o que lhe promove maior proteção pela dificuldade de penetração de soluções nesta camada¹³⁴⁻¹³⁶. Esses resultados estão de acordo com estudo de Zoccolotti et al.²⁹ (2021), os quais observaram que os extratos obtidos de *C. moschata* foram capazes de reduzir o número de unidades formadoras de colônias e o metabolismo celular do biofilme de *C. albicans* formado sobre amostras de resina acrílica para base de próteses, comprovando seu efeito antimicrobiano. Todavia, nenhum estudo foi encontrado na literatura em relação aos biofilmes simples de *S. mutans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans* utilizando o protocolo de tratamento com *C. moschata*, impossibilitando a comparação com outros resultados e destacando a importância do presente estudo.

Nas amostras de reembasador rígido, os resultados mostraram que houve redução dos microrganismos no grupo experimental quando comparado ao grupo sem tratamento. Porém, para todos os tipos de biofilme, a redução foi de 2 log's. Essa menor redução em comparação à resina de base pode ser justificada pela superfície do material. Estudos comprovam que o material reembasador possui maior rugosidade superficial em comparação às resinas de base, fato que contribui para o acúmulo de biofilme⁸⁻¹⁰. Verifica-se também na literatura de que a adesão de microrganismos também é significativamente maior em superfícies ásperas do que em superfícies lisas^{137,138}.

O potencial antimicrobiano do extrato de *Cryptocarya moschatta* pode estar relacionado à composição química da planta. A caracterização química dos extratos brutos foi realizada por meio de cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas (UPLC-DAD-MS) em estudo prévio²⁹ e os resultados podem ser observados nos Anexos A e B. A análise UHPLC-DAD-MS revelou a presença de diferentes flavonóides, os quais podem explicar o efeito antifúngico encontrado. No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre a morte celular ainda é desconhecido.

Os danos dos componentes da matriz extracelular dos biofilmes foram avaliados após os tratamentos. A matriz polimérica extracelular representa aproximadamente 90% da biomassa total do biofilme e pode atuar como uma barreira

física de proteção para as células. Sua espessura e composição química podem impedir a difusão de antimicrobianos nas camadas mais profundas dos biofilmes, tornando essas células tolerantes aos tratamentos^{139,140}. Os componentes visualizados em vermelho foram marcados com Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain. Essa sonda fluorescente tem sido utilizada para corar os componentes proteicos da matriz de biofilmes¹¹⁰. Este corante marca a maioria das classes de proteínas, incluindo glicoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, proteínas de ligação de cálcio, proteínas fibrilares e outras proteínas, que são difíceis de corar. Nesse estudo, utilizou-se esse marcador a fim de avaliar se os componentes proteicos da matriz polimérica extracelular dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* sofreriam danos após os tratamentos com extrato de *C. moschatta*. Foi possível verificar que houve uma menor detecção de fluorescência nos grupos tratados com o extrato em comparação com os grupos controles negativos de PBS (grupos sem tratamentos). O resultado foi observado tanto para as amostras de resina de base de prótese, quanto para as amostras de reembasador. Assim foi possível concluir que, além de diminuir as unidades formadoras de colônias, o tratamento também foi capaz de causar danos na matriz extracelular.

As imagens obtidas a partir da microscopia de varredura confocal a laser estão de acordo com os resultados dos testes descritos acima. Além disso, conforme mostrado nas imagens, a presença de *C. albicans* aumenta a produção de exopolissacarídeos (EPS), de modo que os biofilmes de coespécies acumulam mais biomassa e abrigam mais células do que biofilmes de espécie única²⁶.

É importante destacar que os resultados do presente estudo são promissores, uma vez que os extratos tiveram efeito antimicrobiano em biofilmes simples e misto, os quais são bem mais resistentes do que as células planctônicas. As interações dos biofilmes formados entre bactérias e fungos podem alterar o ambiente e aumentar a virulência da doença, dificultando ainda mais o tratamento. Novos estudos com esse tipo de biofilme devem ser conduzidos com o objetivo de descobrir novas estratégias de prevenção e tratamento mais efetivas no controle de doenças como a estomatite protética.

7 CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os resultados obtidos e as limitações do presente estudo, pôde-se concluir que:

Estudo I: A solução de sabonete Lifebuoy® foi capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colônias e o metabolismo celular dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre amostras de resina acrílica para base e reembasador de próteses, tanto para o protocolo de prevenção, como para o de desinfecção.

Estudo II: O protocolo de tratamento utilizando-se o extrato de *C. moschata* foi capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colônias dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre amostras de resina acrílica para base e reembasador de próteses. Além disso, o tratamento causou danos aos componentes da matriz extracelular.

REFERÊNCIAS*

1. Gulland A. Global life expectancy increases by five years. *BMJ*. 2016; 353: i2883.
2. Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, Li G, Foreman K, Ezzati M. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *Lancet*. 2017; 389(10076): 1323-35.
3. Carlsson GE, Omar R. The future of complete dentures in oral rehabilitation. A critical review. *J Oral Rehabil*. 2010; 37(2): 143-56.
4. Hassan M, Asghar M, Din SU, Zafar MS. Thermoset polymethacrylate-based materials for dental applications. *In: Grumezescu V, Grumezescu AM, editors. Materials for biomedical engineering. Amsterdam: Elsevier; 2019; p. 273-308.*
5. Nejatian T, Pezeshki S, Yaqin Syed AU. Acrylic denture base materials. *In: Khurshid Z, Najeeb S, Zafar MS, Sefat F, editors. Advanced dental biomaterials. Cambridge: Woodhead Publishing; 2019. p. 79-104.*
6. Zafar MS. Prosthodontic Applications of Polymethyl Methacrylate (PMMA): an update. *Polymers (Basel)*. 2020; 12(10): 2299.
7. Pisani MX, Malheiros-Segundo Ade L, Balbino KL, de Souza RF, Paranhos Hde F, da Silva CH. Oral health related quality of life of edentulous patients after denture relining with a silicone-based soft liner. *Gerodontology*. 2012; 29(2): 474-80.
8. Murata H, Chimori H, Hong G, Hamada T, Nikawa H. Compatibility of tissue conditioners and denture cleansers: influence on surface conditions. *Dent Mater J*. 2010; 29(4): 446-53.
9. Nikawa H, Jin C, Makhira S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. *J Oral Rehabil*. 2003; 30: 243-250.
10. 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: 308-310.
11. Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*-mediated Oral Diseases. *J Dent Res*. 2016; 95(4): 365-71.

* 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>

12. Vila T, Rizk AM, Sultan AS, Jabra-Rizk MA. The power of saliva: Antimicrobial and beyond. *PLoS Pathog*. 2019 Nov 14;15(11): 1008058.
13. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J Fungi (Basel)*. 2020; 6(1): 15.
14. Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jørgensen E, W?och S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 1996; 25(8): 411-5.
15. Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000; 28(2): 141-9.
16. Feltrin PP, Tortamano N, Jaeger RG, Araújo VC. Estomatite protética: estudo da superfície interna da prótese total em microscopia eletrônica de varredura e da mucosa de suporte através de exame citológico, histopatológico imunohistoquímico. *Rev Assoc Bras Odontol*. 1993; 1(1): 31-8.
17. 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.
18. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by Candida species. *Aust Dent J*. 1998; 43(3): 160-6.
19. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J*. 1998; 43(4): 244-9.
20. Sultan AS, Kong EF, Rizk AM, Jabra-Rizk MA. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. *PLoS Pathog*. 2018 Jan 25;14(1): 1006719.
21. Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJ. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014; 26(4): 85.
22. Van Dijck P, Brown NA, Goldman GH, Rutherford J, Xue C, Van Zeebroeck G. Nutrient Sensing at the Plasma Membrane of Fungal Cells. *Microbiol Spectr*. 2017;5(2).
23. Nobbs AH, Jenkinson HF, Everett DB. Generic determinants of Streptococcus colonization and infection. *Infect Genet Evol*. 2015; 33: 361-70.
24. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of Candida albicans biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(8): 672-80.

25. Diaz PI, Xie Z, Sobue T, Thompson A, Biyikoglu B, Ricker A, Ikonomou L, Dongari-Bagtzoglou A. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect Immun*. 2012; 80(2): 620-32.
26. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, Gonzalez-Begne M, Watson G, Krysan DJ, Bowen WH, Koo H. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82(5): 1968-81.
27. Kim D, Sengupta A, Niepa TH, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS, Murata RM, Stebe KJ, Lee D, Koo H. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep*. 2017; 7: 41332.
28. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20(19): 5678-98.
29. Zoccolotti JO, Cavaleiro AJ, Tasso CO, Ribas BR, Ferrisse TM, Jorge JH. Antimicrobial efficacy and biocompatibility of extracts from *Cryptocarya* species. *PLoS One*. 2021 Dec 31;16(12): 0261884.
30. Ribeiro SM, Fratucelli ÉDO, Fernandes JM, Bueno PCP, Cavaleiro AJ, Klein MI. Systematic Approach to Identify Novel Antimicrobial and Antibiofilm Molecules from Plants' Extracts and Fractions to Prevent Dental Caries. *J Vis Exp*. 2021; (169).
31. Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2004; 4: 33-8.
32. Cavaleiro AJ, Yoshida M. 6-[omega-arylalkenyl]-5,6-dihydro-alpha-pyrone from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). *Phytochemistry*. 2000; 53(7): 811-9.
33. Nehme CJ, Moraes PLR, Tininis AG, Cavaleiro AJ. Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae). *Bioch Syst Ecol*. 2008. 36: 602-11.
34. Bandeira KF, Cavaleiro AJ. An LC-DAD Fingerprinting Method for Alkaloids, Flavonoids and Styrylpyrones from *Cryptocarya mandioccana*. *Chromatographia*. 2009; 70:1455-60.
35. Ricardo MAG, Andreco MA, Cavaleiro AJ, Castro-gamboa IC, Bolzani VS, Silva DHS. Bioactive pyrones and flavonoids from *Cryptocarya aschersoniana* seedlings. *Arkivoc*. 2004. 6: 127-136.

36. Telascrea M, Araújo CC, Cavaleiro AJ, Marques MOM, Facanali R, Moraes PLR. Essential oils from leaves of *Cryptocarya* spp. from the atlantic rain forest. *Quim Nova* 31. 2008: 503-507.
37. Giocondo MP, Bassi CL, Telascrea M, Cavaleiro AJ, Bolzani VS, Silva DHS, Agustoni D, Melo ER, Soares CP. Cryptomoschatone D2 from *Cryptocarya mandiocana*: cytotoxicity against human cervical carcinoma cell lines. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2009; 30: 315-22.
38. de Oliveira Zoccolotti J, Cavaleiro AJ, Tasso CO, de Oliveira CC, Ribas BR, Ferrisse TM, de Souza Costa CA, Jorge JH. In vivo antifungal activity and biocompatibility of *Cryptocarya moschata*. *Arch Microbiol.* 2022; 204(9): 569.
39. Fimble A, Lynch S, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 415-28.
40. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(9): 563-75.
41. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms.* 2017; 5(2): pp E15.
42. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999; 12(2): 153-9.
43. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE. Eradication of a mature methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. *Braz Dent J.* 2013; 24(5): 487-91.
44. Karakis D, Akay C, Oncul B, Rad AY, Dogan A. Effectiveness of disinfectants on the adherence of *Candida albicans* to denture base resins with different surface textures. *J Oral Sci.* 2016; 58(3): 431-7.
45. Hayran Y, Sarikaya I, Aydin A, Tekin YH. Determination of the effective anticandidal concentration of denture cleanser tablets on some denture base resins. *J Appl Oral Sci.* 2018; 18(26): 20170077
46. Amaya Arbeláez MI, Vergani CE, Barbugli PA, Pavarina AC, Sanitá PV, Jorge JH. Long-Term Effect of Daily Chemical Disinfection on Surface Topography and *Candida Albicans* Biofilm Formation on Denture Base and Reline Acrylic Resins. *Oral Health Prev Dent.* 2020; 18(1): 999-1010.
47. Bell JA, Brockmann SL, Feil P, Sackuvich DA. The effectiveness of two disinfectants on denture base acrylic resin with an organic load. *J Prosthet Dent.* 1989; 61(5): 580- 583.

48. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ho CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont* 2008;17(8): 627-633.
49. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol.* 2008; 57(pt 8): 966-973.
50. Sagripanti JL, Bonifacino A. Cytotoxicity of liquid disinfectants. *Surg Infect.* 2000; 1:3- 14.
51. Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfectants in infection control. *Dent Clin North Am.* 1991; 35(2): 323-37.
52. Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effects of various disinfectant solutions on the surface hardness of an acrylic resin denture base material. *Int J Prosthodont.* 1993; 6(1):9-12.
53. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003; 30: 532-536.
54. Zoccolotti JO, Tasso CO, Arbeláez MIA, Malavolta IF, Pereira ECDS, Esteves CSG, Jorge JH. Properties of an acrylic resin after immersion in antiseptic soaps: Low-cost, easy-access procedure for the prevention of denture stomatitis. *PLoS One.* 2018; 13(8): e0203187.
55. Zoccolotti JO, Suzuki RB, Rinaldi TB, Pellissari CVG, Sanitá PV, Jorge JH. Physical properties of artificial teeth after immersion in liquid disinfectant soaps. *Am J Dent.* 2019; 32(1): 14-20.
56. Tasso CO, de Oliveira Zoccolotti J, Ferrisse TM, Malavolta IF, Jorge JH. Effectiveness of Disinfectant Liquid Soaps in the Reduction of *Candida* spp Present in Complete Dentures: A Crossover Randomized Clinical Trial. *Int J Prosthodont.* 2020; 33(6): 620-628.
57. Malavolta IF, Tasso CO, Ferrise TM, Zoccolotti JD, Amaya Arbeláez MI, Sanitá PV, Jorge JH. Biological and physical properties of a reline acrylic resin after immersion in liquid antiseptic soaps. *Am J Dent.* 2021; 34(3): 150-156.
58. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.
59. Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000; 28(5): 390-8.
60. Budtz-Jørgensen E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *J Am Dent Assoc.* 1978; 96(3): 474-9.

61. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987; 14(3): 217-27.
62. Jeganathan S, Lin CC: Denture stomatitis-a review of the aetiology, diagnosis, and management. *Aust Dent J* 1992; 37: 107- 114 management. *Aust Dent J* 1992; 37:107- 114.
63. Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol Scand.* 1970; 28(1): 71-92.
64. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Dent.* 2014; 42: 99-106.
65. Frenkel H, Harvey I, Newcombe RG: Oral health care among nursing home residents in Avon. *Gerodontology.* 2000; 17: 33- 38.
66. Souza JC, Mota RR, Sordi MB, Passoni BB, Benfatti CA, Magini RS. Biofilm Formation on Different Materials Used in Oral Rehabilitation. *Braz Dent J.* 2016; 27(2): 141-7.
67. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci.* 2007; 64(4): 180-9.
68. Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(5): 419-24.
69. Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract.* 2000; 1(2): 28-41.
70. Branting C, Odén A, Wiatr-Adamczak E, Linder LE, Sund ML. Adhesion of *Streptococcus rattus* and *Streptococcus mutans* to metal surfaces. *Scand J Dent Res.* 1988; 96(3): 218-25.
71. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(2): 86-94.
72. 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 Mar;14(3):243-9.
73. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 10(2): 112-22.
74. Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res.*1991; 37: 91-105.

75. Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol.* 2005; 175(11): 7512-8.
76. Øilo M, Bakken V. Biofilm and Dental Biomaterials. *Materials (Basel).* 2015; 8(6): 2887-900.
77. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 53-59
78. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(3): 359-83.
79. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80: 903-908.
80. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(8): 672-80.
81. Bakhshi M, Taheri JB, Shabestari SB, Tanik A, Pahlevan R. Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. *Gerodontology.* 2012; 29(2): 680-4.
82. Maciel AJ, Lacerda CP, Danielli LJ, Bordignon SAL, Fuentefria AM, Apel MA. Antichemotactic and Antifungal Action of the Essential Oils from *Cryptocarya aschersoniana*, *Schinus terebinthifolia*, and *Cinnamomum amoenum*. *Chem Biodivers.* 2019; 16(8): e1900204.
83. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11: 119.
84. Alavarce RAS, Saldanha LL, Almeida NLM, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. The beneficial effect of *Equisetum giganteum* L. against *Candida* biofilm formation: New approaches to denture stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 939625.
85. Pinelli LAP, Montandon AAB, Corbi SCT, Moraes TA, Fais LMG. *Ricinus communis* treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. *J Oral Rehabil.* 2013; 40(5): 375-380.

86. Pina GM, Lia EN, Berretta AA, Nascimento AP, Torres EC, Buszinski AF, de Campos TA, Coelho EB, Martins VP. Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017; 2017: 8971746.
87. Dumontet V, Van Hung N, Adeline MT, Riche C, Chiaroni A, Sévenet T, Guéritte F. Cytotoxic flavonoids and alpha-pyrone from *Cryptocarya obovata*. *J Nat Prod*. 2004; 67(5): 858-62.
88. Moraes PLR. Taxonomy of *Cryptocarya* species of Brazil. In: *Abc Taxa*, 2007. v. 3, p. 1-191.
89. Ricardo, MAG.; Andreco, MA.; Cavaleiro, AJ.; Castro-gamboa, IC.; Bolzani, VS.; Silva, DHS. Bioactive pyrones and flavonoids from *Cryptocarya aschersoniana* seedlings. *Arkivoc*. 2004; 127-136.
90. Giocondo MP, Bassi CL, Telascrea M, Cavaleiro AJ, Bolzani VS, Silva DHS, Agustoni D, Melo ER, Soares CP. Cryptomoschatone D2 from *Cryptocarya mandiocana*: cytotoxicity against human cervical carcinoma cell lines. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2009. 30: 315-22.
91. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013; 28(2): 83-101.
92. Sumi Y, Miura H, Michiwaki Y, Nagaosa S, Nagaya M. Colonização da placa dentária por patógenos respiratórios em idosos dependentes. *Arch Gerontol Geriatr*. 2007; 44: 119 - 124.
93. Apratim A, Shah SS, Sinha M, Agrawal M, Chhaparia N, Abubakkar A. Denture hygiene habits among elderly patients wearing complete dentures. *J Contemp Dent Pract*. 2013; 14(6): 1161-4.
94. Pitt WG, Ross SA. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnol Prog*. 2003; 19(3): 1038-44.
95. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Palomari Spolidorio DM, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. *J Dent*. 2009; 37(9): 666-72.
96. Basso MF, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Compagnoni MA. Influence of microwave disinfection on the linear dimensional stability of complete dentures: a clinical study. *Int J Prosthodont*. 2010; 23: 318-320.
97. Badaró MM, Salles MM, de Arruda CNF, Oliveira VC, de Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. In Vitro Analysis of Surface Roughness of Acrylic Resin Exposed to the Combined Hygiene Method of Brushing and Immersion in *Ricinus communis* and Sodium Hypochlorite. *J Prosthodont*. 2017; 26(6):516-21.

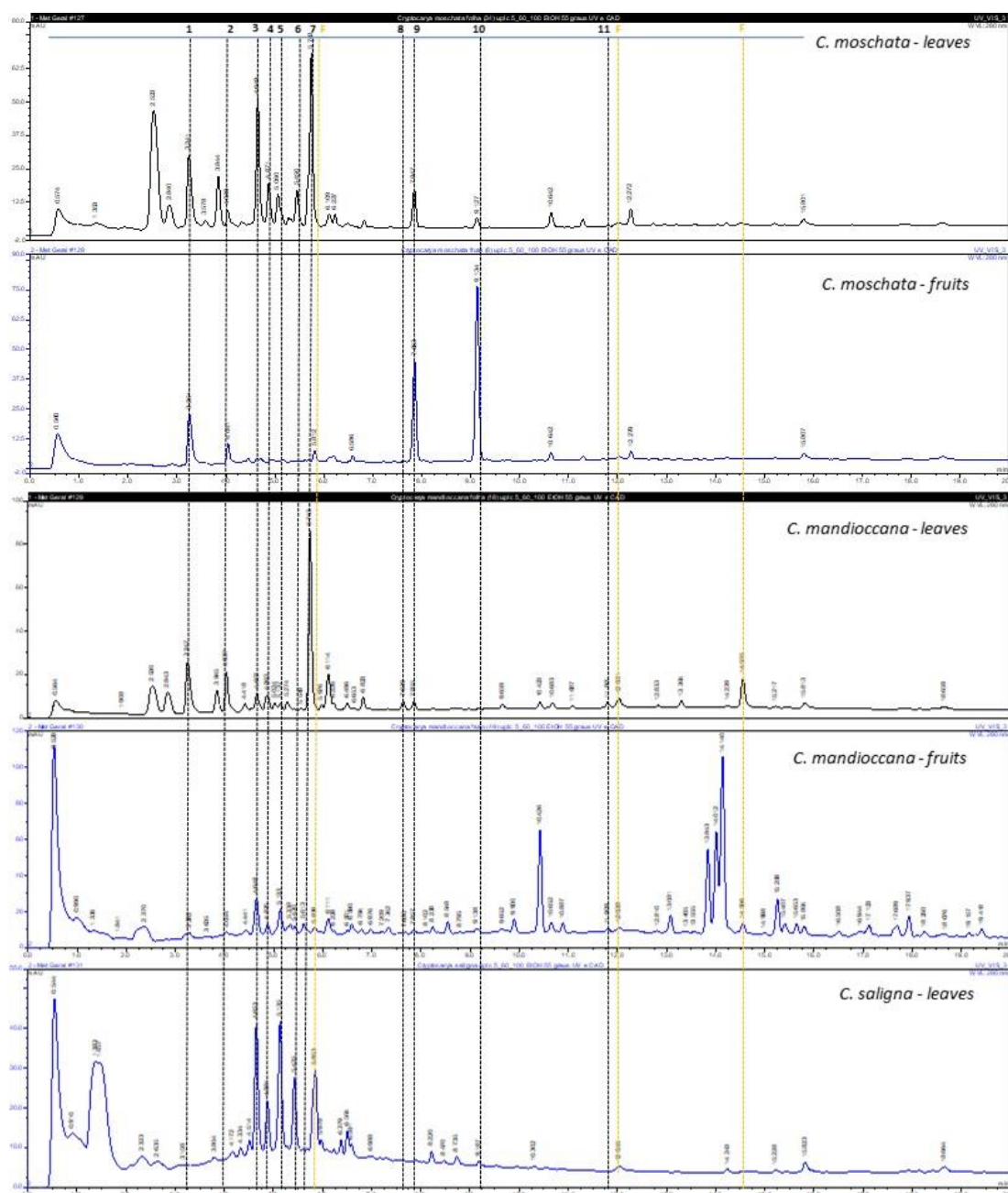
98. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999; 12(2): 153-9.
99. Izumida FE, Jorge JH, Ribeiro RC, Pavarina AC, Moffa EB, Giampaolo ET. Surface roughness and *Candida albicans* biofilm formation on a reline resin after long-term chemical disinfection and toothbrushing. *J ProsthetDent.* 2014; 112(6): 1523-9.
100. Pero AC, Barbosa DB, Marra J, Ruvolo-Filho AC, Compagnoni MA. Influence of microwave polymerization method and thickness on porosity of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008; 17(2):125-9.
101. Nowakowska-Toporowska A, Raszewski Z, Wieckiewicz W. Color change of soft silicone relining materials after storage in artificial saliva. *J Prosthet Dent.* 2016; 115(3): 377-80.
102. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(3): 340-4.
103. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of postpolymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(3): 203-7.
104. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and postpolymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007; 24(1): 52-7.
105. 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(10): 93-100.
106. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effects of short- term immersion and brushing with different denture cleansers on the roughness, hardness, and color of two types of acrylic resin. *Am J Dent.* 2015; 28(3):150-6.
107. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. *Mycoses.* 2011; 54(5): 344-51.
108. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623- 33.

109. Fulaz S, Vitale S, Quinn L, Casey E. Nanoparticle-Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends Microbiol.* 2019; 27(11): 915-926.
110. Wu C, Labrie J, Tremblay YD, Haine D, Mourez M, Jacques M. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol.* 2013; 115(1): 30-40.
111. Zago LHP, de Annunzio SR, de Oliveira KT, Barbugli PA, Valdes BR, Feres M, Fontana CR. Antimicrobial photodynamic therapy against metronidazole-resistant dental plaque bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2020; 209: 111903.
112. Alzayyat ST, Almutiri GA, Aljandan JK, Algarzai RM, Khan SQ, Akhtar S, Matin A, Gad MM. Antifungal Efficacy and Physical Properties of Poly(methylmethacrylate) Denture Base Material Reinforced with SiO₂ Nanoparticles. *J Prosthodont.* 2021; 30(6):500-8.
113. Susewind S, Lang R, Hahnel S. Biofilm formation and *Candida albicans* morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses.* 2015; 58(12): 719-27.
114. Peltola P, Vehkalahti MM, Wuolijoki-Saaristo K. Oral health and treatment needs of the long-term hospitalised elderly. *Gerodontology.* 2004; 21(2): 93-9.
115. Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract.* 2000; 1(2): 28-41.
116. Brondani MA, Samim F, Feng H. A conventional microwave oven for denture cleaning: a critical review. *Gerodontology.* 2012; 29(2): 6-15.
117. Mendonça MJ, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Weight loss and surface roughness of hard chairside reline resins after toothbrushing: influence of postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont.* 2006; 19(3): 281-7.
118. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG et al. Microwave disinfection of complete dentures contaminated in vitro with selected bacteria. *J Prosthodont.* 2009; 18(7): 611-7.
119. Gama MC, de Oliveira DG, da Silva PM, Ordinola-Zapata R, Duarte MH, Porto VC. Antifungal activity of 4% chlorhexidine and 2% sodium hypochlorite against *Candida albicans* biofilms. *Gen Dent.* 2015; 63(5): 43-7.
120. Amaya Arbeláez MI, Vergani CE, Barbugli PA, Pavarina AC, Sanitá PV, Jorge JH. Long-Term Effect of Daily Chemical Disinfection on Surface Topography and *Candida Albicans* Biofilm Formation on Denture Base and Reline Acrylic Resins. *Oral Health Prev Dent.* 2020; 18(1): 999-1010.

121. Peracini A, Machado Andrade I, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Oliveira Pagnano V, Watanabe E, Oliveira Paranhos HF. Antimicrobial action and long-term effect of overnight denture cleansers. *Am J Dent.* 2017; 30(2): 101-108.
122. de Oliveira CE, Gasparoto TH, Dionísio TJ, Porto VC, Vieira NA, Santos CF, Lara VS. *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont.* 2010; 23(2): 158-9.
123. Yassin SA, German MJ, Rolland SL, Rickard AH, Jakubovics NS. Inhibition of multispecies biofilms by a fluoride-releasing dental prosthesis copolymer. *J Dent.* 2016; 48: 62-70.
124. Mantzourani M, Gilbert SC, Fenlon M, Beighton D. Non-oral bifidobacteria and the aciduric microbiota of the denture plaque biofilm. *Mol Oral Microbiol.* 2010; 25(3):190-9.
125. Sanchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R (2013). Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(10): 1318-26.
126. Cakan U, Yuzbasioglu E, Kurt H, Kara HB, Turunç R, Akbulut A, Aydin KC. Assessment of hygiene habits and attitudes among removable partial denture wearers in a university hospital. *Niger J Clin Pract.* 2015; 18(4): 511-5.
127. Ribas BR, Tasso CO, Ferrisse TM, Jorge JH. Influence of brushing with antiseptic soap solution on the surface and biological properties of an acrylic denture base resin. *Am J Dent.* 2022; 35(5): 238-44.
128. Ribas BR, Tasso CO, Ferrisse TM, Jorge JH. Influence of brushing with an antiseptic soap solution on the surface and biological properties of a hard chairside relined resin. *Am J Dent.* 2022; 35(6): 291-6.
129. Rocha MM, Carvalho AM, Coimbra FCT, Arruda CNF, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Paranhos HFO. Complete denture hygiene solutions: antibiofilm activity and effects on physical and mechanical properties of acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 2021;29: 20200948.
130. Barnabé W, de Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Sclaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(5): 453-9.
131. Devine DA, Percival RS, Wood DJ, Tuthill TJ, Kite P, Killington RA, Marsh PD. Inhibition of biofilms associated with dentures and toothbrushes by tetrasodium EDTA. *J Appl Microbiol.* 2007; 103(6): 2516-24.
132. Manh Ha N, The Son N. The Genus *Cryptocarya*: A Review on Phytochemistry and Pharmacological Activities. *Chem Biodivers.* 2023; 20(3): 202201102.

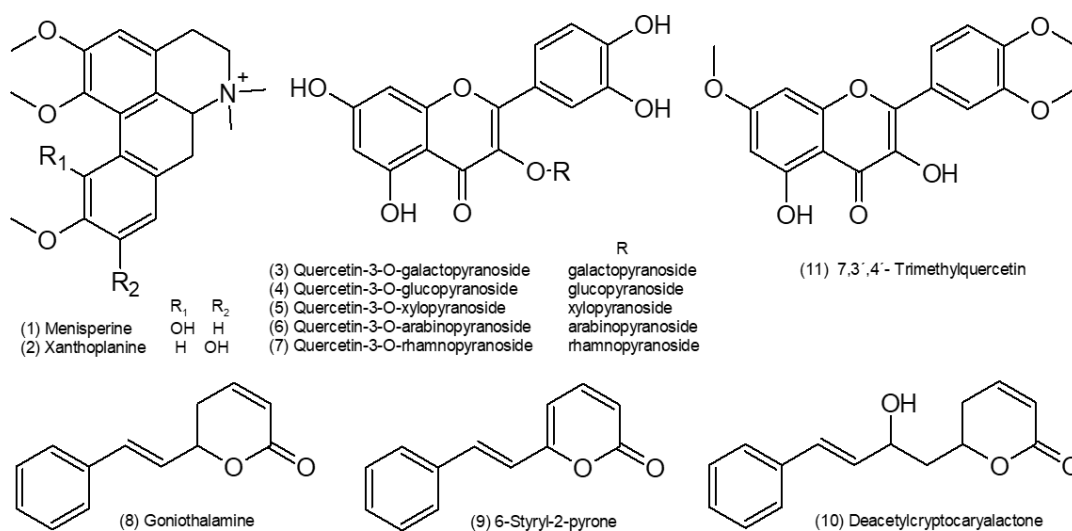
133. Simões RJ; Fonseca P; FigueiraL MH. Oral infections by *Candida* spp. *Odontol. Clín.-Cient. (Online)* vol.12 no.1 Recife Jan./Mar. 2013.
134. Engel AS, Kranz HT, Schneider M, Tietze JP, Piwowarczyk A, Kuzius T, Arnold W, Naumova EA. Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity. *BMC Oral Health*. 2020; 20(1): 162.
135. Shemesh M, Tam A, Steinberg D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology (Reading)*. 2007; 153(Pt 5): 1307-1317.
136. Takahashi N, Iwasa F, Inoue Y, Morisaki H, Ishihara K, Baba K. Evaluation of the durability and antiadhesive action of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine grafting on an acrylic resin denture base material. *J Prosthet Dent*. 2014; 112(2): 194-203.
137. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent*. 1997; 77(5): 535-9.
138. Huh JB, Lim Y, Youn HI, Chang BM, Lee JY, Shin SW. Effect of denture cleansers on *Candida albicans* biofilm formation over resilient liners. *J Adv Prosthodont*. 2014; 6(2): 109-14.
139. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(9): 623-33.
140. Fulaz S, Vitale S, Quinn L, Casey E. Nanoparticle-Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends Microbiol*. 2019; 27(11): 915-26.

ANEXO A – UHPLC-DA chromatograms from the *Cryptocarya* extracts, plotted at 280 nm. Chromatographic conditions. Kinitex® XB-C18 column (50 x 2.1 mm, 2.6 μ m, 100 Å, Phenomenex), eluted with ultrapure water (A) and ethanol (B), both with 0.1 % of formic acid, in gradient mode (5 to 60 %B in 20 min) at a flow rate of 0.5 mL/min. Numbers 1-11 refer to identified compounds. F = unidentified flavonoids (ZOCLOTTI et al., 2021).



Zoccolotti JO, Cavaleiro AJ, Tasso CO, Ribas BR, Ferrisse TM, Jorge JH. Antimicrobial efficacy and biocompatibility of extracts from *Cryptocarya* species. PLoS One. 2021 Dec 31;16(12): 0261884.

ANEXO B - Molecular structures of the main compounds identified in the *Cryptocarya* extracts (ZOCCOLOTTI et al., 2021).



Zoccolotti JO, Cavaleiro AJ, Tasso CO, Ribas BR, Ferrisse TM, Jorge JH.
Antimicrobial efficacy and biocompatibility of extracts from *Cryptocarya* species.
PLoS One. 2021 Dec 31;16(12): 0261884.

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos a partir desta data

Direitos de publicação reservado ao autor

Araraquara, 7 de Agosto de 2023

Camilla Olga Tasso