



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

GABRIELLA QUEIRÓZ COSTA

Efeito antagonista de probióticos vivos sobre o crescimento de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias.

Araçatuba

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

GABRIELLA QUEIRÓZ COSTA

Efeito antagonista de probióticos vivos sobre o crescimento de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia de
Araçatuba da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, como
parte dos requisitos para a obtenção do
Título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Duque

Araçatuba

2017

A Deus, que sempre me deu forças e me fez chegar até aqui.

*Aos meus pais, Denize Nair Queiróz Costa e Aureo Cândido Costa Júnior, que
sempre me apoiaram durante todo o caminho para me tornar quem sou hoje e
conquistar tudo que conquistei.*

A minha irmã Rafaella Queiróz Costa por me ensinar a ser leve e doce sempre.

AGRADECIMENTOS

Obrigada meu Deus por me guiar para os caminhos certos e sempre estar ao meu lado me dando forças e me livrando de todo mal.

Aos meus pais, Aureo Cândido Costa Júnior e Denize Nair Queiróz Costa, por estarem sempre do meu lado (mesmo que longe), por sempre acreditarem, apoiarem e darem condições para a realização dos meus sonhos. Obrigada pelo amor incondicional que sempre tive. Sem vocês eu não seria nada. Amo vocês!

À minha irmã, Rafaella Queiroz Costa por sempre me dar o amor mais puro que existe. Obrigada por todo companheirismo, carinho e compreensão. Sou eu que me espelho em você.

Ao meu namorado Lucas Lourenço por toda ajuda, apoio e amor que sempre me deu.

Aos amigos que fiz durante a graduação, em especial às minhas amigas que levo pra vida Ana Flávia Hordones, Marynara Fraga, Barbara Curi, Mariana Bis e Priscila Toninatto. Muito obrigada por cada momento juntas!

Aos amigos que estão longe, mesmo com toda a distância sempre me apoiaram e incentivaram durante esta caminhada.

Aos meus parceiros de pesquisa, o futuro doutorando Bruno Guandalini, a mestranda Isabela Catanose, sem vocês não teria sido possível a realização desse projeto! Boa sorte e muito sucesso!

A Vanessa e ao Jesse, por toda ajuda durante o caminho, vocês foram essenciais.

À minha orientadora, Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti pelo carinho, atenção e ajuda durante esses anos de trabalho! Obrigada pela oportunidade de ser sua orientanda e aprender com você, sou eternamente grata!

A minha Co-orientadora, Profa. Dra. Cristiane Duque pela disponibilidade e ajuda durante esse projeto. Obrigada por todo conhecimento compartilhado.

Ao departamento de Odontopediatria que nos cedeu espaço para trabalhar.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo, por acreditar e subsidiar nosso trabalho.

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, em especial aos professores, que contribuíram para a minha formação, dividindo suas experiências e transmitindo seus conhecimentos, minha gratidão eterna.

Aos professores da banca examinadora, Aldieres e Daniela, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

*"Cada nova ideia que nos penetra irá
desorganizar nosso sistema de pensar e
derrubá-lo como a um castelo de cartas.
Reconstituí-lo é avançar!"*

Flávio Gikovate

COSTA, G.Q. **Efeito antagonista de probióticos vivos sobre o crescimento de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias.** 2017. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

A estomatite protética é frequentemente associada à colonização microbiana da base acrílica das próteses, favorecida pela higiene deficiente das mesmas e pelo alto nível de *Candida spp.* na cavidade oral. A *Candida albicans* é a espécie fúngica mais comumente associada à esta patologia oral, geralmente tratada com antifúngicos. O uso indiscriminado destas drogas pode promover resistência destas cepas e efeitos colaterais aos indivíduos. Assim, é desejável promover a saúde por meio de terapias naturais ou alternativas, tais como a utilização de microrganismos probióticos. Eles estão disponíveis como suplementos dietéticos e são comumente adicionados aos alimentos, incluindo uma larga variedade de microrganismos, como os *Lactobacillus*. Os probióticos são conhecidos pela capacidade de inibirem o crescimento de microrganismos patogênicos pela ação competitiva, antagônica e imunológica. Estudos têm mostrado resultados promissores sobre a ação dos probióticos na cavidade bucal, no entanto, a literatura é escassa na interação materiais dentários e probióticos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar *in vitro*, a influência de dois diferentes probióticos na inibição do crescimento e metabolismo do biofilme de *C. albicans* em resina acrílica ativada termicamente (RAAT) para base protética e verificar se os subprodutos dos biofilmes teriam um potencial de alteração da superfície das amostras de RAAT. 30 amostras de RAAT foram divididas em 3 grupos: GI- controle negativo (*Candida albicans* sem probiótico - GC); GII- *Lactobacillus casei*; GIII- *Lactobacillus rhamnosus*. Biofilmes de *C. albicans* foram formados sobre as superfícies das amostras de RAAT na presença dos probióticos. Para a quantificação do biofilme, o número de células cultiváveis nas amostras de RAAT foi avaliado por contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) e pelo ensaio de redução de XTT. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. Na quantificação do biofilme em UFC/mL, houve diferença estatística significativa entre os valores médios dos diferentes grupos de biofilmes. *C. albicans* (GC) apresentou uma média de $15,35 \times 10^5$ UFC/mL nas amostras de RAAT. A menor

contagem de UFC/mL foi a obtida pelo biofilme formado na presença de *L. casei*, com valor médio de $2,49 \times 10^5$ UFC/mL. Para o biofilme de *C. albicans*, formado na presença de *L. rhamnosus*, o valor médio foi de $7,26 \times 10^5$ UFC/mL). *C. albicans* exibiu uma redução de 83,76% após interação com células de *L. casei*, e uma redução de 52,69%, após interação com células de *L. rhamnosus*. Na análise do metabolismo celular (XTT), *L. casei* interferiu na atividade metabólica do biofilme de *C. albicans*, com redução de 43,22% do metabolismo celular. Enquanto *L. rhamnosus* não apresentou redução efetiva no metabolismo celular da *C. albicans* (5,83%). A rugosidade da RAAT não foi alterada após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos ($p > 0,05$). Conclui-se que os probióticos testados interferiram no metabolismo e crescimento de *Candida albicans*, mas não alteraram a rugosidade em superfície de resina acrílica para próteses dentárias após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos.

Palavras-chave: Probióticos, Biofilmes, *Candida albicans*, Resinas acrílicas, Estomatite sob prótese.

COSTA, G.Q.. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Prosthetic stomatitis is frequently associated with the microbial colonization of the acrylic base of the prostheses, favored by the poor hygiene of the same and the high level of *Candida* spp. in the oral cavity. *Candida albicans* is the fungal species most commonly associated with this oral pathology, usually treated with antifungal. The indiscriminate use of these drugs can promote resistance of these strains and side effects to individuals. Thus, it is desirable to promote health through natural or alternative therapies, such as the use of probiotic microorganisms. They are available as dietary supplements and are commonly added to foods, including a wide variety of microorganisms, such as *Lactobacillus*. Probiotics are known for their ability to inhibit the growth of pathogenic microorganisms by competitive, antagonistic and immunological action. Studies have shown promising results on the action of probiotics in the oral cavity, however, literature is sparse in the interaction between dental materials and probiotics. The aim of this research was to evaluate the influence of two different probiotics on the inhibition of growth and metabolism of *C. albicans* biofilm in thermally activated acrylic resin (RAAT) for prosthetic base and to verify if biofilm byproducts would have a potential for change of the surface of RAAT samples. 30 RAAT samples were divided into 3 groups: GI- negative control (*Candida albicans* without probiotic - GC); GII- *Lactobacillus casei*; GIII- *Lactobacillus rhamnosus*. Biofilms of *C. albicans* were formed on the surfaces of RAAT samples in the presence of probiotics. For biofilm quantification, the number of cultured cells in the RAAT samples was evaluated by counting colony forming units (CFUs) and the XTT reduction assay. The data were submitted to statistical analysis. In the quantification of the biofilm in CFU / mL, there was a statistically significant difference between the mean values of the different groups of biofilms. *C. albicans* (GC) presented an average of 15.35×10^5 UFC / mL in the RAAT samples. The lowest UFC / mL count was obtained by the biofilm formed in the presence of *L. casei*, with a mean value of 2.49×10^5 UFC / mL. For the biofilm of *C. albicans*, formed in the presence of *L. rhamnosus*, the mean value was 7.26×10^5 CFU / mL). *C. albicans*

showed a reduction of 83.76% after interaction with *L. casei* cells, and a 52.69% reduction after interaction with *L. rhamnosus* cells. In the analysis of cellular metabolism (XTT), *L. casei* interfered in the metabolic activity of the *C. albicans* biofilm, with a reduction of 43.22% in cellular metabolism. While *L. rhamnosus* did not present an effective reduction in the cellular metabolism of *C. albicans* (5.83%). The RAAT roughness was not altered after exposure to different microbial biofilms ($p > 0.05$). It is concluded that probiotics tested interfered in the metabolism and growth of *Candida albicans* on acrylic resin surface for dental prostheses.

Keywords: *Candida albicans*, *Candida* biofilm, Probiotics, Antifungal effect Stomatitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Matriz Metálica	17
Figura 2 -	Conjunto lâmina de vidro e matriz metálica	17
Figura 3 -	(A) Inclusão em mufla do conjunto matriz/lâmina de vidro. (B) Segunda lâmina de vidro posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com silicone de condensação Zetalabor	18
Figura 4 -	(A) Mufla preenchida com gesso pedra tipo III. (B) Prensa hidráulica de bancada	18
Figura 5 -	Resina acrílica ativada termicamente (RAAT)	18
Figura 6 -	Amostras de RAAT	19
Figura 7 -	Amostra de RAAT após acabamento e polimento	19
Figura 8 -	Padronização da espessura das amostras	19
Figura 9 -	Leitura das amostras de RAAT, posicionadas no rugosímetro	20
Figura 10 -	Amostras de RAAT coladas nos poços da placa de poliestireno	21
Figura 11 -	Placas das culturas de <i>C. albicans</i> e dos probióticos <i>L. rhamnosus</i> . e <i>L. casei</i>	22
Figura 12 -	Plaqueamento de <i>C. albicans</i>	23
Figura 13 -	Diluições decimais seriadas	25
Figura 14 -	Plaqueamento para contagem de UFCs	25
Figura 15 -	Contagem manual de UFCs	25
Figura 16 -	Placa após contagem de UFCs	26
Figura 17 -	Teste de XTT - leitura colorimétrica realizada em espectrofotômetro a 492 nm	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios (desvio padrão) da contagem de UFC/mL e porcentagem de redução (%), obtidos nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos.	28
Tabela 2 -	Valores médios (desvio padrão) da absorbância (D.O.) obtidos nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos.	29
Tabela 3 -	Análise de Variância (ANOVA) medidas repetidas, com dois fatores de rugosidade da RAAT exposta a diferentes biofilmes microbianos.	31
Tabela 4 -	Valores médios $\pm$ desvio padrão de rugosidade da RAAT exposta a diferentes biofilmes microbianos.	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Contagem de UFC/mL ($\times 10^5$) dos biofilmes formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos	28
Gráfico 2 -	Redução (%) do metabolismo celular dos biofilmes de <i>C. albicans</i> , na presença dos probióticos, em relação ao grupo controle.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

RAAT Resina acrílica ativada termicamente

BHI Brain heart infusion

DO Densidade óptica

SDA Sabouraud dextrose ágar

UFC Unidade formadora de colônia

L. Lactobacillus

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
3	METODOLOGIA	16
	3.1. Confeção das amostras em resina acrílica ativada termicamente	16
	3.2. Avaliação da rugosidade de superfície	20
	3.3. Determinação dos grupos do estudo	21
	3.4. Curvas de crescimento dos microrganismos	21
	3.5. Ensaio de biofilme	22
	3.5.1. Cepas e condições de crescimento	22
	3.5.2. Formação do biofilme de <i>C. albicans</i> na presença dos probióticos	24
	3.5.3. Quantificação das células viáveis	24
	3.6. Avaliação da atividade metabólica (ensaio de XTT)	26
4	FORMA DE ANÁLISE DOS DADOS	27
5	RESULTADOS	28
	5.1. Resultados da contagem de UFCs	28
	5.2. Resultados do XTT	29
	5.3. Resultados de rugosidade de superfície	31
6	DISCUSSÃO	32
7	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população idosa é uma realidade no cenário brasileiro e um fenômeno mundial, consequentemente muitos pacientes usuários de próteses são ou serão idosos no futuro. É fato que o uso de próteses dentárias favorece a retenção de biofilme e o desenvolvimento de infecções (Sutula et al., 2012). Em virtude do processo de envelhecimento acarretar alterações fisiológicas (senescência) e ser agravado por certas condições patológicas predisponentes (senilidade), os idosos tendem a perder a capacidade funcional para as atividades diárias (Montenegro, 2005), sendo a higiene bucal uma delas.

Alguns fatores associados, como o declínio da resposta imunológica, a higiene bucal deficiente e a diminuição da salivagem pelo uso constante de medicamentos favorecem a proliferação de leveduras, contribuindo para a proliferação de *Candida spp.* na cavidade bucal de idosos (Ishikawa et al., 2015; Altarawneh et al., 2012; Salerno et al., 2011; Lockhart et al., 1999). Estes microrganismos estão normalmente presentes na cavidade bucal e, geralmente não causam patologias. Porém, sob certas circunstâncias, estes podem agir como agentes infecciosos, causando o aparecimento de candidíase (Salerno et al., 2011).

A estomatite protética é frequentemente associada à colonização microbiana da base acrílica das próteses dentárias, favorecida pela higiene deficiente das mesmas e pelo alto nível de *Candida spp.* na saliva (Pires et al., 2002; Thein et al., 2007; Shay et al., 1997). *Candida albicans* é a espécie fúngica mais comumente associada à estomatite protética, sendo responsável por cerca de 24-75% dos casos de infecção (Jeganathan; Lin, 1992; Webb et al., 1998; Cannon; Chaffin, 1999; Barbeau et al., 2003; Coco et al., 2008). Estudos mostram que outras patologias podem estar associadas ao biofilme da prótese, como por exemplo, infecções gastrointestinais e pulmonares, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou idosos, pela deglutição e aspiração contínua de microrganismos do biofilme da prótese (Arkel; Shinnick, 2003).

Geralmente estas patologias são tratadas à base de antifúngicos poliênicos (nistatina) e azólicos (fluconazol, miconazol, itraconazol). O uso indiscriminado de drogas antifúngicas pode trazer como consequência, a resistência destas cepas aos agentes antimicrobianos (Williams; Lewis, 2011; Niimi et al., 2010). Além disso, o miconazol interage com outras drogas e induz alterações hepáticas. A nistatina tem

um sabor desagradável, e alguns indivíduos apresentam desconforto gastrointestinal, como náuseas, vômitos e diarreia (Oliver et al., 2004). Assim, é desejável promover a saúde por meio de terapias naturais ou alternativas, tais como a utilização de microrganismos probióticos.

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde dos indivíduos (Gill; Guarner, 2004), além de promoverem uma melhora no sistema gastrointestinal quando consumidos em alimentos (leites fermentados, queijos, iogurtes, etc.), efeito já extensivamente estudado sobre a flora intestinal (Spanhaak et al., 1998; Manzoni et al., 2006; Tuohy et al., 2007; Meijer; Dieleman, 2011). Os probióticos estão disponíveis como suplementos dietéticos e são comumente adicionados aos alimentos como iogurte, sucos, leite e produtos de soja, incluindo uma larga variedade de microrganismos, como os *Lactobacillus*. Os probióticos são conhecidos por sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos pela ação competitiva, antagônica, e imunológica, tendo a capacidade de melhorar os mecanismos de defesa do hospedeiro, estimulando a proliferação de bactérias benéficas (Ishikawa et al., 2015).

Alguns estudos têm mostrado resultados promissores sobre a ação dos probióticos contra as espécies de *Candida* presentes na cavidade oral (Ishikawa et al., 2015; Li et al., 2014; Hasllof et al., 2010; Hatakka et al., 2007; Sookkhee et al., 2001). No entanto, a literatura é escassa na interação materiais dentários e probióticos. Estes resultados poderão ser úteis no desenvolvimento de terapias tópicas e na prevenção da formação de biofilme associado às doenças bucais, como a estomatite protética.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro*:

- a influência de dois diferentes probióticos (*L. casei* e *L. rhamnosus*), normalmente utilizados em produtos alimentícios, na inibição do crescimento e metabolismo do biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica para base protética;
- verificar se os subprodutos dos biofilmes teriam um potencial de alteração da superfície das amostras de RAAT.

A hipótese deste trabalho foi de que os probióticos vivos utilizados inibiriam o crescimento e o metabolismo da *C. albicans* em amostras de RAAT.

3 METODOLOGIA

3.1 Confeção das amostras em resina acrílica ativada termicamente (RAAT)

Foram confeccionadas 30 amostras de RAAT (VipiCril Plus, VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga, São Paulo, Brasil), utilizando-se uma matriz metálica (Fig. 1) vazada na espessura de 3 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada (n=10). Esta matriz foi posicionada sobre uma lâmina de vidro retangular (80 mm x 35 mm x 3 mm) e seu interior foi preenchido com cera utilidade (Wilson, Polidental Ind. E Com. Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil). Em seguida o conjunto lâmina de vidro e matriz metálica (Fig. 2) foi incluído em mufla (Vipi STG, VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga, São Paulo, Brasil). Para isso, a superfície interna da base da mufla foi isolada com vaselina em pasta, sendo preenchida em seguida com gesso pedra tipo III (Asfer; São Caetano do Sul, SP, Brasil), seguindo a proporção de 100 g de pó para 30 mL de água, espatulado por 1 minuto e vertido sob vibração constante (Fig. 3A). Após a cristalização do gesso, uma segunda lâmina de vidro com as mesmas dimensões já citadas foi posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com silicone de condensação Zetalabor (Zhermack, Rovigo, Italy; Fig. 3B). A contra-mufla foi posicionada e, sobre a superfície desta última lâmina de vidro foi vertido gesso pedra tipo III (Fig. 4A). Em seguida, a mufla foi levada à prensa hidráulica de bancada (VH, Midas Dental Produtos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil) sob pressão constante de 1000 Kgf por 2 minutos (Fig. 4B). Após a cristalização do gesso, a mufla foi aberta e a cera removida do interior de cada superfície interna da matriz. A superfície do vidro foi limpa com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil). A RAAT (Fig. 5) foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante e, ao atingir a fase plástica, foi inserida no interior das superfícies internas da matriz incluída em mufla. Após a inserção, a contra-mufla foi posicionada e levada à prensa hidráulica, com força de 1000 Kgf, durante 2 minutos, depois foi transferida para uma prensa manual e realizada a polimerização de bancada por 30 minutos. A resina foi polimerizada pelo método convencional, de acordo com o fabricante. Após a polimerização da resina, a mufla foi aberta e as amostras foram removidas (Fig. 6) e submetidas ao polimento em

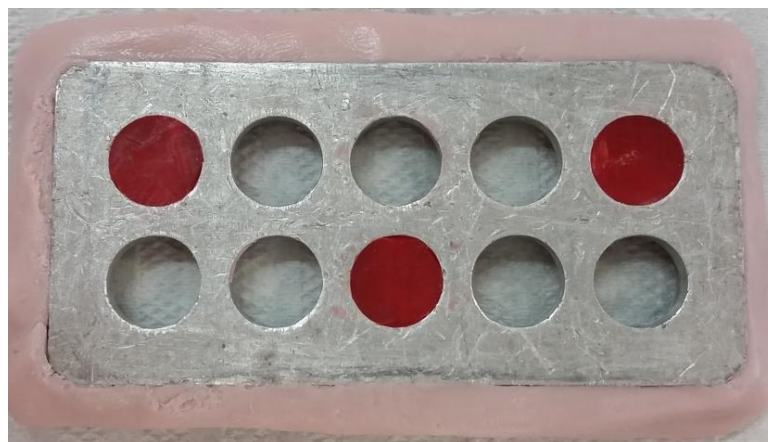
uma politriz universal semiautomática (Arotec S.A. Ind Com, Cotia, São Paulo, Brasil), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (400, 600, 800 e 1200 - Buehler, Illinois, EUA), sendo posteriormente finalizadas com solução diamantada em disco de feltro (Fig. 7). Em seguida foi realizada a padronização da espessura das amostras numa faixa de 2,5 a 2,6 mm, utilizando a lixa de granulação 400 com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda; Fig. 8). Por fim, as amostras foram submetidas à limpeza em ultrassom (Ultracleaner 1400; UNIQUE) por 20 min em água destilada, para remoção de possíveis debris na superfície da resina, e após isso foram deixadas ao ar livre para secagem.

Figura 1 - Matriz Metálica



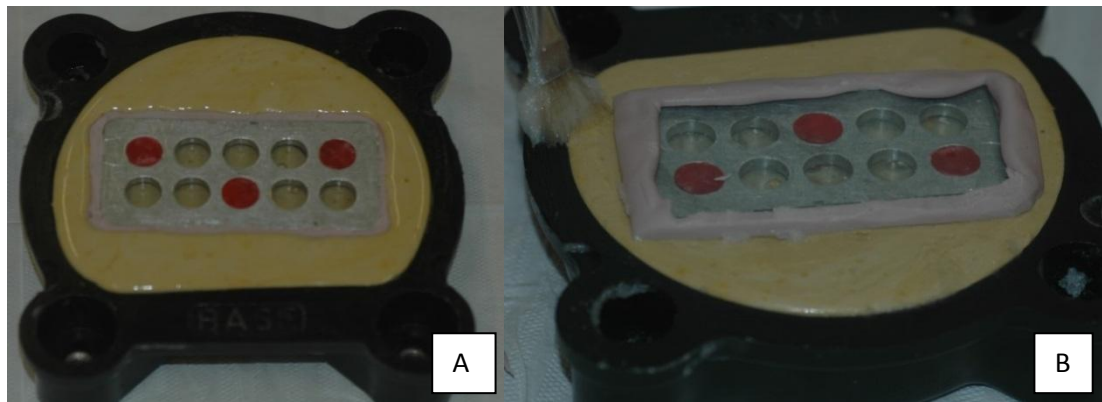
Fonte: Do Autor

Figura 2 - Conjunto lâmina de vidro e matriz metálica



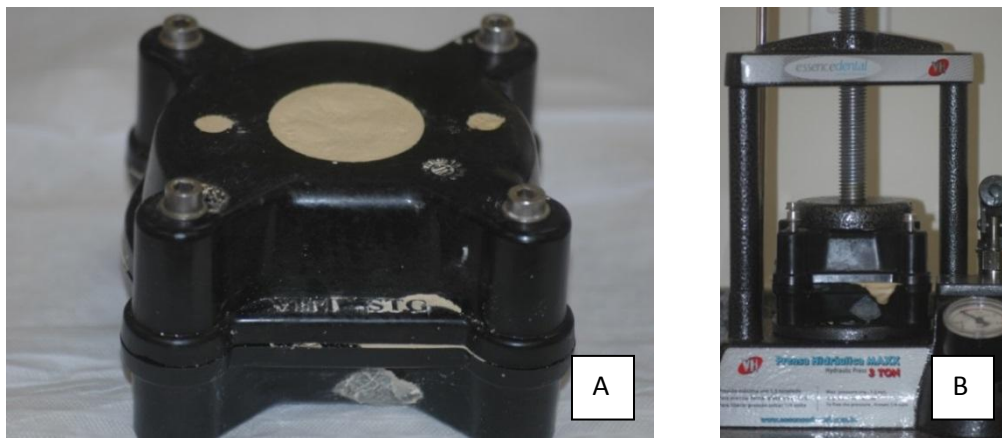
Fonte: Do Autor

Figura 3 – (A) Inclusão em mufla do conjunto matriz/lâmina de vidro. (B) Segunda lâmina de vidro posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com silicone de condensação Zetalabor



Fonte: Do Autor

Figura 4 - (A) Mufla preenchida com gesso pedra tipo III. (B) Prensa hidráulica de bancada



Fonte: Do Autor

Figura 5 - Resina acrílica ativada termicamente (RAAT)



Fonte: Do Autor

Figura 6 - Amostras de RAAT



Fonte: Do Autor

Figura 7 - Amostra de RAAT após acabamento e polimento



Fonte: Do Autor

Fig. 8. Padronização da espessura das amostras.

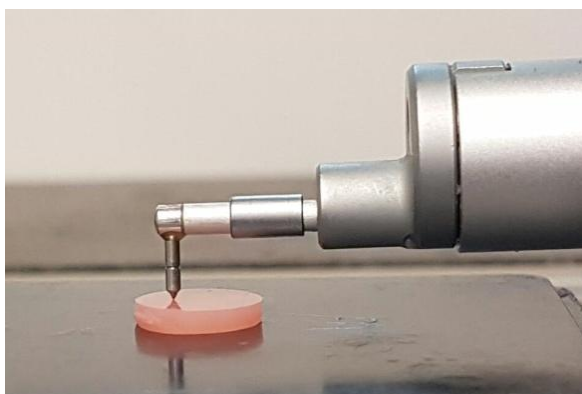


Fonte: Do Autor

3.2 Avaliação da rugosidade de superfície

A fim de selecionar as amostras com padrões de superfície semelhantes para os ensaios de biofilme, as amostras de RAAT tiveram sua rugosidade de superfície (R_a - μm) mensurada por meio de um rugosímetro (Mitutoyo SJ-401; Mitutoyo Corp., Tóquio, Japão). As amostras de RAAT foram posicionadas individualmente no rugosímetro com a superfície submetida à análise sempre voltada para cima (Fig. 9), sendo executadas três leituras paralelas para mensurar a rugosidade de superfície (R_a) inicial. A extensão de cada leitura foi de 1,25 mm, com cut-off de 0,25 mm. A velocidade da leitura foi de 0,1mm/seg. Os valores de rugosidade iniciais foram obtidos pela média aritmética e dados em micrometros. Esta análise foi realizada em 10 amostras de cada grupo (baseline), escolhidas aleatoriamente. Após a leitura de rugosidade, as amostras foram coladas com fita dupla face no interior de poços de placas de poliestireno (24 poços) e esterilizadas com óxido de etileno (Oximed, São José do Rio Preto, SP, Brasil - Fig. 10), para serem posteriormente submetidas à adesão e formação dos biofilmes de *C. albicans*, e *C. albicans* + probióticos. Novas leituras foram realizadas após a simulação dos biofilmes, a fim de verificar se os subprodutos dos biofilmes teriam um potencial de alteração da superfície das amostras de RAAT.

Figura 9 – Leitura das amostras de RAAT, posicionadas no rugosímetro



Fonte: Do Autor

Figura 10 – Amostras de RAAT coladas nos poços da placa de poliestireno



Fonte: Do Autor

3.3 Determinação dos grupos do estudo

As seguintes cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) foram utilizadas neste estudo: *C. albicans* (ATCC 26790); *L. casei* (ATCC 393) e *L. rhamnosus* (ATCC 9595). Essas cepas microbianas foram fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ.

As 30 amostras de RAAT foram divididas nas placas de 24 poços, em 3 grupos (n=5), perfazendo dois ensaios independentes (n=10 no total): GI- controle *Candida albicans* sem probiótico; GII- *Candida albicans* e *Lactobacillus casei*; GIII- *Candida albicans* e *Lactobacillus rhamnosus*.

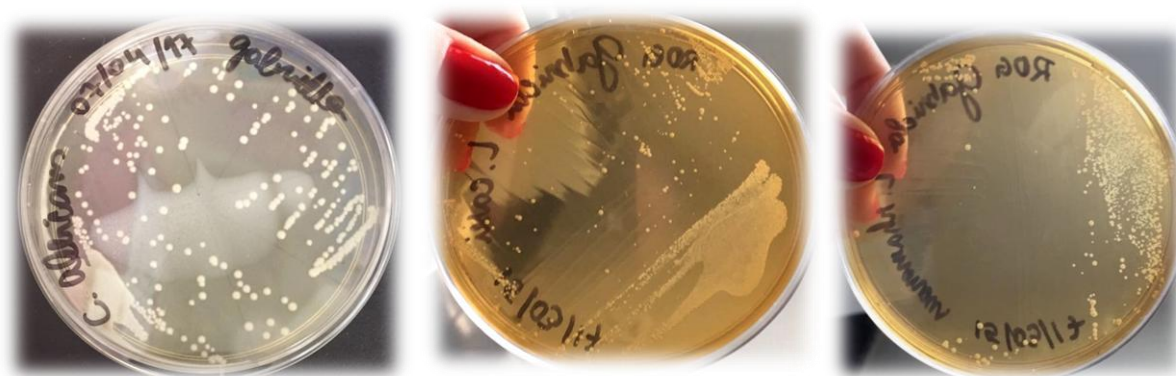
3.4 Curvas de crescimento dos microrganismos

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório Multidisciplinar da disciplina de Odontopediatria – FOA/UNESP.

As cepas de *L. casei* e *L. rhamnosus* previamente congeladas em freezer - 80° C foram reativadas em meio Rogosa Agar (OXOID, M.R.S. AGAR de man, Rogosa, Sharpe), acrescido de ácido acético, por 48 horas em estufa de CO₂. A cepa de *C. albicans* foi reativada em meio Sabouraud Dextrose Ágar (ASD; Difco, Le Pont de Claix, França) por 24h. Para a padronização do inóculo para os ensaios de biofilme foram realizadas curvas de crescimento para os microrganismos avaliados no estudo. Cerca de 5 colônias de cada microrganismo foram inoculadas em tubo de

ensaio contendo 5 mL de BHI caldo contendo 1% de glicose e incubados em estufa por 18h a 24h. Após esse período, 500 µL da cultura de cada microrganismo foram inoculados separadamente em novos tubos contendo 5 mL do BHI contendo 1% de glicose. A cada 2 horas foram realizadas leituras da densidade óptica (DO) no espectrofotômetro (a 550 nm) até o valor da leitura se estabilizar e as culturas plaqueadas em meios específicos para obtenção dos valores de Unidades Formadoras de Colônias /mL (UFC/mL). Foram definidos os valores de densidade óptica (D.O.) entre 0,3 a 0,4 para a *C. albicans* (10^6 UFC/mL) e entre 0,9 e 1,0 (10^9 UFC/mL) para os probióticos.

Figura 11 – Placas das culturas de *C. albicans* e dos probióticos *L. rhamnosus* e *L. casei*



Fonte: Do Autor

3.5 Ensaios de biofilme (Monteiro et al., 2015)

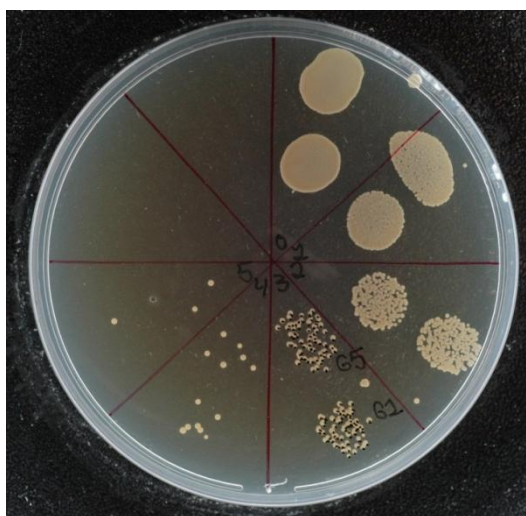
3.5.1. Cepas e condições de crescimento

Após o conhecimento da D.O. dos microrganismos estabelecida por curva de crescimento, foram iniciados os testes de ensaio de biofilme. *L. casei* e *L. rhamnosus* foram descongelados e repicados em Rogosa Ágar e *C. albicans* em Ágar Sabouraud Dextrose para reativação, da mesma maneira em que foi realizado nas curvas de crescimento. Logo após a reativação, uma alçada de cada probiótico foi coletada das placas e inoculadas em 20 mL de meio BHI caldo suplementado com glicose (1%) e a *C. albicans* foi inoculada em 6 mL do meio caldo Sabouraud dextrose e então, mantidos em estufa de CO₂ por 24 horas, a 37 °C.

Após o período de incubação foram retirados 500 µL do overnight da *C. albicans* e adicionados em um tubo novo, contendo 6 mL de caldo Sabouraud dextrose para crescimento de células novas e obtenção da D.O. entre 0,3 e 0,4 nm como estabelecido nas curvas de crescimento. Por volta de 2 a 3 horas depois, a D.O. foi atingida e então foi feito o plaqueamento para posterior contagem de colônias (Fig. 12). Foram retirados 2 mL da cultura e colocados em dois microtubos (1,0 mL em cada) para realizar a centrifugação a 8000 rpm por 5 min, e obtenção do 'pellet' da *C. albicans*. Após o primeiro ciclo de centrifugação, foi retirado o caldo e adicionado 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7) para lavar as células. Posteriormente, elas foram agitadas no vórtex, e outro ciclo de centrifugação foi realizado para a obtenção do 'pellet' novamente. Após este procedimento, a solução tampão foi retirada e as células de *C. albicans* foram diluídas 10x em saliva artificial (2 mL da *C. albicans* para 18 mL de saliva artificial).

A saliva artificial foi manipulada baseada no protocolo de Lanfom et al. (2003), e a sua composição em 1 litro de água deionizada será a seguinte: 2g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich), 5g de peptona bacteriológica (Sigma-Aldrich), 2g de glicose (Sigma-Aldrich), 1g de mucina de estômago de porco (Sigma-Aldrich), 0,35 g de NaCl (Sigma-Aldrich), 0,2g de CaCl₂ (Sigma-Aldrich) e 0,2g de KCl (Sigma-Aldrich).

Figura 12 – Plaqueamento de *C. albicans*



Fonte: Do autor

3.5.2 Formação do biofilme de *C. albicans* na presença dos probióticos

Após a diluição de *C. albicans* em saliva artificial (citada acima), biofilmes de *C. albicans* foram formados sobre as superfícies das amostras de RAAT previamente coladas no interior de poços de placas de poliestireno (24 poços). 1 mL deste inóculo (4×10^6 células/mL em saliva artificial) foi adicionado aos poços contendo as amostras. As placas foram incubadas em agitadora orbital (126 rpm) a 37 °C, por 2 h para permitir a adesão celular inicial nas superfícies das amostras. Em seguida, o meio foi removido e as amostras foram suavemente lavadas com 1 mL de PBS (pH 7, $0,1 \text{ mol l}^{-1}$) para remover as células não aderidas.

Enquanto as amostras estavam na agitadora, foi realizada a leitura da D.O. dos probióticos no espectrofotômetro e logo após, eles foram individualmente centrifugados para a obtenção dos 'pellets'. O caldo BHI + glicose 1% foi retirado e adicionado um caldo fresco para nutrir as células, a quantidade adicionada foi o suficiente para chegar na D.O. entre 0,9 e 1,0.

Após duas horas de aderência inicial da *C. albicans*, a saliva artificial foi retirada e 1 mL de cada probiótico (10^9 células/ml de *casei* e *L. rhamnosus* em BHI + 1% de glicose) foi retirado dos tubos da D.O. já centrifugado e adicionado nos poços respectivos de cada grupo (n=5 em cada grupo). No grupo controle foi adicionado apenas o meio caldo BHI + 1% de glicose. As placas ficaram por 24 horas em estufa de CO₂ para crescimento dos biofilmes. Os experimentos foram realizados em dois ensaios independentes.

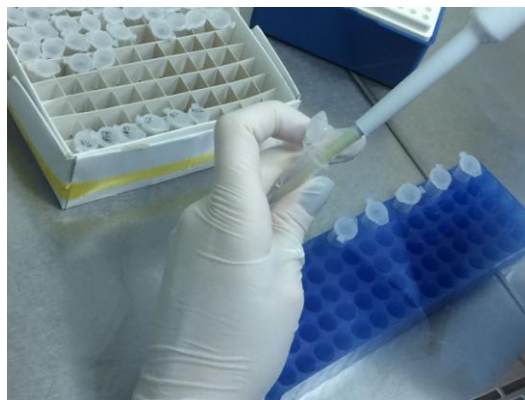
3.5.3. Quantificação das células viáveis

O número de células viáveis dos biofilmes formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos foi avaliado por contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs).

Suspensões de biofilme (20 µL de cultura para 180 µL de solução tampão PBS) foram vigorosamente agitadas durante 90 s e diluições decimais seriadas (em PBS; pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram plaqueadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Le Pont de Claix, França) com 40µg/mL de cloranfenicol, para contagem de colônias de *C. albicans* (Fig. 13 e14).

Após 18-24 h de incubação das placas (para crescimento da *C. albicans*), em estufa de CO₂, a 37 °C, o número de UFCs/mL foi contado manualmente (Fig. 15 e 16).

Figura 13 – Diluições decimais seriadas



Fonte: Do autor

Figura 14 – Plaqueamento para contagem de UFCs



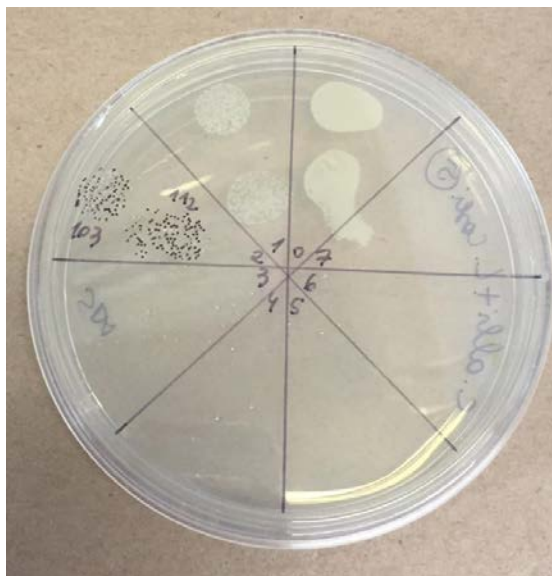
Fonte: Do autor

Figura 15 – Contagem manual de UFCs



Fonte: Do autor

Figura 16 – Placa após contagem de UFCs



Fonte: Do autor

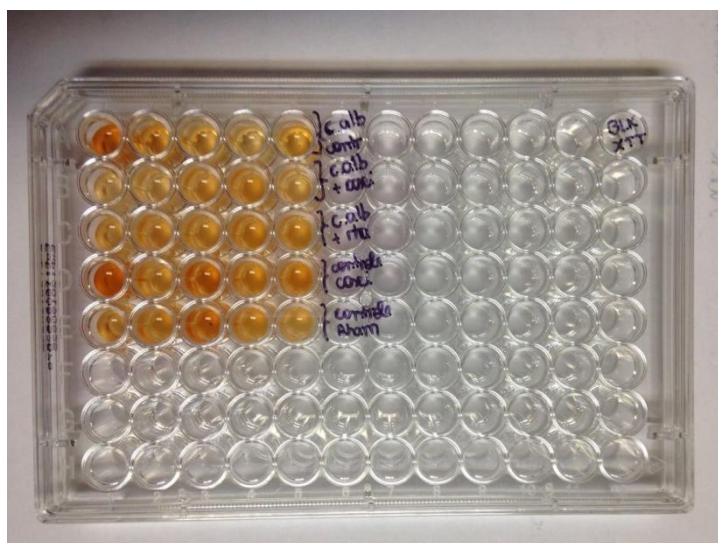
3.6 Avaliação da atividade metabólica (ensaio de XTT)

O efeito inibitório dos probióticos sobre o metabolismo do biofilme de *C. albicans* foi avaliado pelo ensaio de redução de XTT. O ensaio de XTT [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido] é um teste colorimétrico que permite uma estimativa do metabolismo ativo microbiano por redução das enzimas desidrogenase. Uma solução de sal de XTT (Sigma-Aldrich) foi preparada utilizando-se 15 mL de XTT (1 mg/mL em PBS) e 15 mL de solução de Metasulfato (Sigma-Aldrich), preparada imediatamente antes de cada ensaio. Depois disso, todas as amostras de RAAT foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS, retiradas com pinças estéreis e transferidas uma a uma, para tubos de vidro contendo 1 mL de solução de XTT. Os tubos foram levados para uma cuba ultrassônica ao abrigo de luz por 10 minutos e depois foram agitados no vórtex por 1 minuto. Depois, 150 µL de cada tubo foram reservados em microtubos para a realização da diluição e teste de plaqueamento (item 3.5.3).

Os tubos foram enrolados em papel alumínio e incubados durante 3 horas no escuro a 37 °C, em agitadora orbital (126 rpm), para coloração do XTT. Uma alíquota de 200 µL da solução de cada tubo foi transferida para uma nova placa de 96 poços, e a leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro (iMark Leitor de Microplacas; Bio-Rad) a 492 nm (Fig. 17). Os ensaios foram repetidos em duplicata, em duas ocasiões diferentes. Os valores de densidade óptica (D.O.)

obtidos foram transformados em porcentagens para facilitar a análise do metabolismo celular. Os dados de D.O. foram convertidos em dados numéricos (% de metabolismo celular). A equação para cálculo foi: { % de metabolismo das células = $[\text{DO (Amostra teste)} \times 100\%] / [\text{DO (amostra controle)}]$ }.

Figura 17 – Teste de XTT - leitura colorimétrica realizada em espectrofotômetro a 492 nm



Fonte: Do autor

4 FORMA DE ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos em UFC/mL e ensaio de metabolismo celular (XTT) foram submetidos aos testes de aderência à curva normal a fim de determinar se os mesmos provinham ou não de uma distribuição normal. Como a distribuição dos dados foi não-paramétrica, os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney ($\alpha=.05$), realizado comparando os grupos de dois em dois.

Para os dados obtidos no teste de rugosidade, como os mesmos apresentaram uma distribuição normal, a análise de variância (ANOVA) dois fatores, medidas repetidas foi aplicado, seguido do teste de Tukey-Kramer ($\alpha=.05$), a fim de comparar os valores médios de rugosidade das amostras estudadas, utilizando-se o programa IBM SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da contagem de UFCs

Na tabela 1 e gráfico 1 abaixo, estão representados os resultados médios da contagem de UFC/mL ($\times 10^5$) dos biofilmes formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos.

Tabela 1. Valores médios (desvio padrão) da contagem de UFC/mL e porcentagem de redução (%), obtidos nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos

BIOFILMES	UFC/mL ($\times 10^5$) Média/DP	% redução
<i>C. albicans</i>	15,34/ (11,93) a	Grupo controle
<i>C. albicans</i> + <i>L. casei</i>	2,49/ (2,27) b	83,76%
<i>C. albicans</i> + <i>L. rhamnosus</i>	7,26/ (3,21) c	52,69%

Nota: Letras diferentes mostram diferença entre os grupos, de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$).

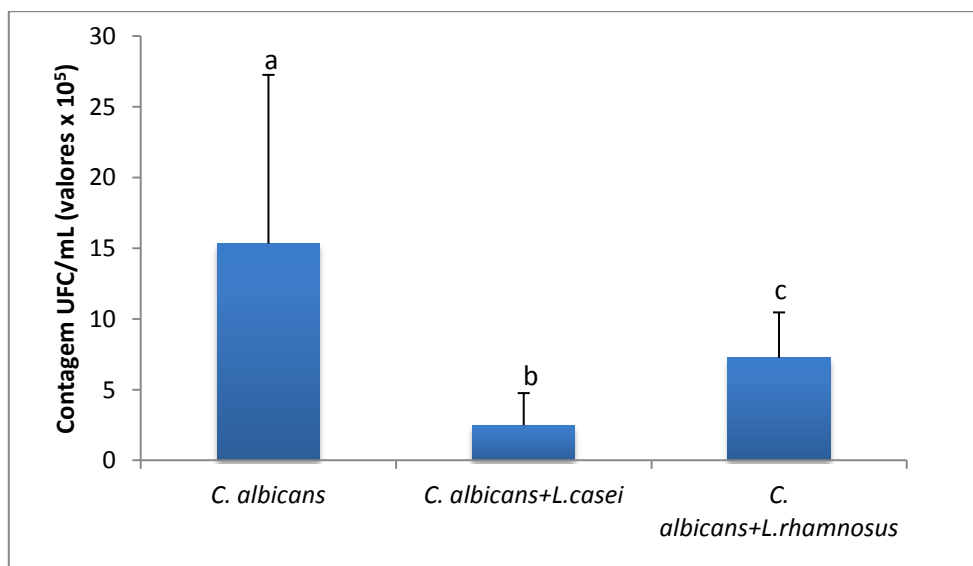


Gráfico 1 - Contagem de UFC/mL ($\times 10^5$) dos biofilmes formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos

Nota: Letras diferentes mostram diferença entre os grupos, de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$).

Foi possível notar que houve diferença estatística significativa entre os valores médios de UFC/mL dos diferentes grupos de biofilmes (Gráfico 1). Na quantificação do biofilme em UFC/mL, *C. albicans* (grupo controle) apresentou uma média de $15,35 \times 10^5$ UFC/mL nas amostras de RAAT. A menor contagem de UFC/mL foi a obtida pelo biofilme formado na presença de *L. casei*, com valor médio de $2,49 \times 10^5$ UFC/mL. Para o biofilme de *C. albicans*, formado na presença de *L. rhamnosus*, o valor médio foi de $7,26 \times 10^5$ UFC/mL. Ficou evidente que os probióticos tiveram um efeito antagonista sobre o crescimento de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias. Na quantificação do biofilme em UFC/mL, *C. albicans* exibiu uma redução de 83,76% em crescimento após interação com células de *L. casei*, e uma redução de 52,69%, após interação com células de *L. rhamnosus*.

5.2 Resultados do XTT

Tabela 2. Valores médios (desvio padrão) da absorbância (D.O.) obtidos nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos

BIOFILMES	Densidade Óptica (492nm) (D.O.) Média/DP
<i>C. albicans</i>	0,72/ (0,48) a
<i>C. albicans</i> + <i>L. casei</i>	0,42/ (0,2) b
<i>C. albicans</i> + <i>L. rhamnosus</i>	0,86/ (0,28) a

Nota: Letras diferentes mostram diferença entre os grupos, de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$).

No gráfico 2 abaixo, estão representados os valores em porcentagem, da redução do metabolismo celular dos biofilmes de *C. albicans*, na presença dos probióticos.

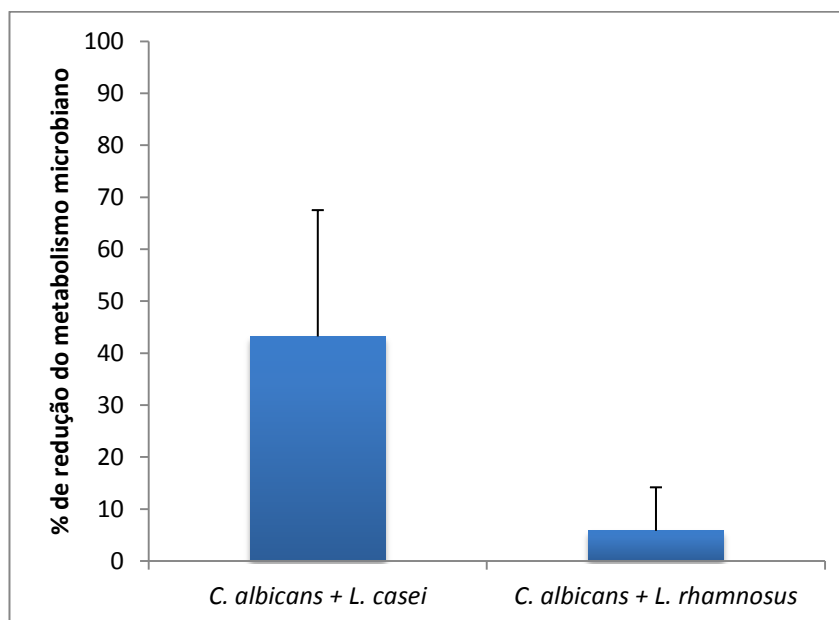


Gráfico 2 – Redução (%) do metabolismo celular dos biofilmes de *C. albicans*, na presença dos probióticos, em relação ao grupo controle.

Na tabela 2 é possível observar que não houve diferença estatística entre o metabolismo celular dos biofilmes de *C. albicans* e *C. albicans* + *L. rhamnosus*. Entretanto, houve diferença entre estes dois grupos e o grupo *C. albicans* + *L. casei*. Estes resultados sugerem que *L. casei* interferiu na atividade metabólica do biofilme de *C. albicans*, com redução de 43,22% do metabolismo celular. Enquanto que o probiótico *L. rhamnosus* não apresentou uma redução efetiva no metabolismo celular da *C. albicans* (5,83%).

5.3 Resultados de rugosidade de superfície

Nas tabelas abaixo, estão apresentadas a análise de variância ANOVA dois fatores, medidas repetidas e os valores médios de rugosidade (R_a - μm) das amostras de RAAT, para os diferentes biofilmes formados.

Tabela 3. Análise de Variância (ANOVA) medidas repetidas, com dois fatores de rugosidade da RAAT exposta a diferentes biofilmes microbianos

Fatores de Variação	SS	df	MS	F	P
Biofilme	,000	2	9,056E-5	2,575	,095
Entre amostras	,001	27	3,516E-5		
Período	4,167E-5	1	4,167E-5	1,501	,231
Biofilme x Período	,000	2	9,056E-5	3,262	,054
Intra amostras	,001	27	2,776E-5		

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significante.

Tabela 4. Valores médios $\pm$ desvio padrão de rugosidade da RAAT exposta a diferentes biofilmes microbianos.

Biofilme bacteriano	Antes da exposição	Após a exposição
<i>C. albicans</i>	0,02 $\pm$ 0,002 Aa	0,025 $\pm$ 0,012 Aa
<i>C. albicans</i> + <i>L. casei</i>	0,02 $\pm$ 0,003 Aa	0,017 $\pm$ 0,005 Aa
<i>C. albicans</i> + <i>L. rhamnosus</i>	0,02 $\pm$ 0,002 Aa	0,023 $\pm$ 0,004 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem ao nível de 5% de

significância ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey.

Conforme a tabela 3 da ANOVA, não houve diferença estatisticamente significativa para os fatores analisados ou para a interação entre eles ($p=0,054$). Assim, pode-se observar na tabela 4, que a rugosidade da RAAT não se alterou significativamente após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos.

6 DISCUSSÃO

A estomatite protética, na maioria dos casos, é devida à infecção por *C. albicans*, sendo um problema comum em idosos e em pacientes imunocomprometidos (Sims et al., 2005; Flevari et al., 2013; Ishikawa et al., 2015). Das várias propriedades de virulência da *C. albicans*, a formação de biofilme em superfícies acrílicas desempenha um papel crítico para a manutenção da higiene oral (Seneviratne et al., 2008; Gow et al., 2012). Biofilmes representam nichos exclusivos, onde os microrganismos são envoltos em uma matriz extracelular, que os protege da ação de agentes antimicrobianos, da saliva e da própria resposta imune do hospedeiro (Chandra et al., 2001; Cochis et al., 2012). A este respeito, os probióticos surgem como alternativa potencial na redução da prevalência de candidíase oral (Hakata et al., 2007; Mailander-Sanchez et al., 2012; Ishikawa et al., 2015).

Valores de rugosidade (Ra) próximos ou inferiores a 0,2 µm dificultam a adesão microbiana (Bollen et al., 1997). Entretanto, observou-se neste estudo que mesmo com nível de rugosidade média inicial de 0,02 µm para as amostras de RAAT, a *C. albicans* foi capaz de aderir na superfície do material. Isso mostra que vários outros fatores, que não apenas a rugosidade, são importantes na colonização microbiana de superfícies, como a hidrofobicidade e a composição química do material (Verran; Maryan, 1997; Sousa et al., 2009). Mesmo após a formação dos biofilmes, os valores de rugosidade permaneceram inferiores a 0,2 µm.

A hipótese deste estudo de que os probióticos vivos utilizados inibiriam o crescimento do biofilme de *C. albicans* em amostras de resina acrílica foi aceita, comprovando seu efeito antagonista. Ficou comprovado com base nos resultados deste estudo, que os probióticos *L. rhamnosus* e *L. casei* possuem atividade contra *C. albicans*. Estes probióticos, em especial *L. casei*, inibiram o crescimento do biofilme de *C. albicans*, apresentando uma redução de 83,76% na contagem de UFC/mL deste fungo, após interação com células deste probiótico, e uma redução de 52,69%, após interação com células de *L. rhamnosus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Song and Lee (2017), que também comprovaram a atividade destes probióticos contra *C. albicans*. Outro estudo, também comprovou a ação antifúngica de probióticos comercialmente disponíveis, principalmente os que

continham espécies de *Lactobacillus*, interferindo na capacidade *in vitro* de *C. albicans* de formar biofilme em materiais protéticos, pelo método do XTT (Ujaoney et al., 2014). A atividade antifúngica dos lactobacilos ocorre por dois mecanismos, em primeiro lugar estas cepas produzem quantidade abundante de ácido láctico, e este ácido se difunde através da membrana do fungo alvo e reduz o pH citoplasmático, causando perda da viabilidade celular (Gerbaldo et al., 2012). Em segundo lugar, eles produzem vários peptídios antifúngicos, que podem romper a membrana do fungo ou inativar moléculas do citoplasma (van Der Weerden et al., 2013).

Estudos clínicos também comprovaram a eficácia do uso de probióticos na redução do nível de infecção por *Candida*. Ishikawa et al. (2015) realizaram um estudo randomizado duplo-cego, com 59 portadores de próteses totais com a presença de *Candida spp.* na cavidade oral, sem sintomas clínicos. Os pacientes foram alocados em dois grupos: probiótico e placebo. Todos os pacientes foram instruídos a limpar a prótese total diariamente. O grupo probiótico depositava uma cápsula contendo probióticos liofilizados (*Lactobacillus Rhamnosus* HS111, *Lactobacillus acidophilus* HS101 e *Bifidobacterium bifidum*) diariamente na superfície palatina da prótese maxilar, enquanto o grupo placebo foi submetido ao mesmo regime usando cápsulas de placebo. Os níveis de *Candida spp.* foram avaliados em amostras de mucosa do palato obtidas antes e após 5 semanas do período experimental. A taxa de detecção de *Candida spp.* foi de 92,0% no grupo placebo, após o período experimental, enquanto que foi reduzido para 16,7% no grupo probiótico.

Um outro estudo clínico também comprovou a eficácia do consumo de um probiótico, o *Lactobacillus casei Shirota*, na redução da quantidade de *Candida* na cavidade bucal (dos Santos et al., 2009). Para tanto, os indivíduos do estudo utilizaram o Yakult LB[®] por 20 dias. Após este período, novas coletas e análises foram realizadas. A análise de IgA anti-*Candida* foi realizada utilizando a técnica ELISA, que teve por objetivo observar se o consumo deste probiótico seria capaz de influenciar na resposta imunológica específica contra *Candida* e reduzir a presença dessas leveduras na cavidade bucal. Amostras de saliva foram coletadas e plaqueadas em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol. A análise dos resultados mostrou uma redução significativa na prevalência de *Candida* (46%) e na contagem de UFC/mL (65%). A análise imunológica demonstrou uma redução significativa nos

níveis de IgA anti-*Candida* após o uso do Yakult, provavelmente devido a uma menor estimulação antigênica. O uso deste probiótico reduziu significativamente a quantidade de *Candida* na cavidade bucal.

Como citado acima, diversos estudos *in vitro* indicam que os probióticos, particularmente os *Lactobacillus*, suprimem o crescimento de *Candida* e o desenvolvimento de biofilmes. Alguns ensaios clínicos também comprovaram o benefício dos probióticos na redução da colonização oral, vaginal e entérica por *Candida*, com alívio dos sinais e sintomas clínicos, e, em alguns casos, reduzindo a incidência de infecção fúngica invasiva em pacientes críticos (Hatakka et al., 2007; dos Santos et al., 2009; Ishijima et al. 2012; Li et al. 2014; Ishikawa et al. 2015; Kraft-Bodi et al., 2015).

Estas observações são particularmente importantes devido ao aumento da incidência de infecções orais, especialmente por outras espécies de *Candida spp*, como a *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*, que são resistentes a agentes antifúngicos (ten Cate et al., 2009). O surgimento da resistência aos medicamentos e os efeitos colaterais dos antifúngicos atualmente disponíveis, restringem seu uso como agentes profiláticos de longo prazo para infecções fúngicas (Matsubara et al., 2016). Por estas razões, a indicação dos probióticos é promissora para a prevenção e tratamento da estomatite relacionada com próteses dentárias, representando um método alternativo em reduzir a colonização por *Candida*.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, conclui-se que:

- os probióticos *L. casei* e *L. rhamnosus* reduziram o metabolismo e crescimento de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias.
- a rugosidade da RAAT não foi alterada após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos.

REFERÊNCIAS

1. Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, et al. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow, and dry mouth. *J Prosthodont* 2012; 22:13-22.
2. Arkell S, Shinnick A. Update on oral candidosis. *Nurs Times* 2003; 99(48):52-3.
3. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95:51-9.
4. Brunetti RF, Montenegro FLB. *Odontogeriatrics: notions of clinical interest*. 1ed. São Paulo: Artes Médicas; 2002.
5. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(3):359-83.
6. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80(3): 903-08.
7. Cochis A, Fracchia L, Martinotti MG, Rimondini L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113(6): 755-61.
8. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramagem G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiology and Immunology* 2008; 23(5):377-83.
9. Consani RL, Folli BL, Nogueira MC, Correr AB, Mesquita MF. Effect of Polymerization Cycles on Gloss, Roughness, Hardness and Impact Strength of Acrylic Resins. *Braz Dent J*. 2016; 27(2):176-80.
10. Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *J Oral Microbiol* 2009; 1 Suppl: 1-11.
11. dos Santos AL, Jorge AOC, dos Santos SSF, Gonçalves e Silva CR, Leão MVP. INFLUENCE OF PROBIOTICS ON *Candida* PRESENCE AND IgA ANTI-*Candida* IN THE ORAL CAVITY. *Brazilian Journal of Microbiology* (2009) 40: 960-964.

12. Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: A review. *Clinical Interventions in Aging* 2013; 8: 1199–208.
13. Gerbaldo GA, Barberis C, Pascual L, Dalcero A, Barberis L. Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters* 2012; 332(1): 27–33.
14. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* 2004; 80:516–26.
15. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology* 2012; 10(2): 112–22.
16. Hasllof P, Hedberg M, Twetman S, et al: Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli – An in vitro study. *BMC Oral Health* 2010; 10:1-6.
17. Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, et al: Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly—a randomized controlled trial. *J Dent Res* 2007; 86:125-30.
18. Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, et al. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78:2190–9.
19. Ishikawa KH, Mayer MPA, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, Campos TT, Nakamae AEM. A Multispecies Probiotic Reduces Oral *Candida* Colonization in Denture Wearers
20. Ishikawa KH, Mayer MP, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, Campos TT, Nakamae AE. A multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers. *J Prosthodont* 2015; 24(3): 194-9.
21. Izumida FE, Jorge JH, Ribeiro RC, Pavarina AC, Moffa EB, Giampaolo ET. Surface roughness and *Candida albicans* biofilm formation on a relined resin after long-term chemical disinfection and toothbrushing. *J Prosthet Dent* 2014; 112(6):1523-9.
22. Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis: a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J* 1992;37(2):107-14.
23. Kraft-Bodi E, Jorgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Twetman S. Effect of probiotic bacteria on oral *Candida* in frail elderly. *J Dent Res* 2015; 94: 181S–6.

24. Kraft-Bodi MR, Jørgensen MK, Keller C. Kragelund, and S. Twetman. Effect of Probiotic Bacteria on Oral Candida in Frail Elderly.
25. Li D, Li Q, Liu C, Lin M, Li X, Xiao X, Zhu Z, Gong Q, Zhou H. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of Candida-associated stomatitis. *Mycoses* 2014; 57:141-6.
26. Li, D., Li, Q., Liu, C., Lin, M., Li, X., Xiao, X., Zhu, Z., Gong, Q. and Zhou, H. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of Candida-associated stomatitis. *Mycoses* 2014; 57:141-6.
27. Lockhart SR, Joly S, Vargas K, et al: Natural defenses against Candida colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res* 1999; 78:857-68.
28. Mailander-Sanchez D, Wagener J, Schaller M. Potential role of probiotic bacteria in the treatment and prevention of localised candidosis. *Mycoses* 2012;55(1):17-26.
29. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhannosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1735–42.
30. Matsubara VH, Bandara HMHN, Mayer MPA, Samaranayake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clinical Practice* 2016; 62: 1143.
31. Meijer BJ, Dieleman LA. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases update: 2011. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: S139–44.
32. Monteiro, D.R., Feresin, L.P., Arias, L.S., Barão, V.A., Barbosa, D.B. and Delbem, A.C. (2015) Effect of tyrosol on adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to acrylic surfaces. *Med Mycol* 2015; 53:656-65.
33. Montenegro FLB. A Odontogeriatrica e o envelhecimento saudável. *Rev Assoc Paul Cirur Dent* 2005; 1(2):6-7.
34. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 2010; 98: 15–25.
35. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent Bristol* 1998; 26(4):299-304.
36. Oliver RJ, Dhaliwal HS, Theaker ED, et al: Patterns of antifungal prescribing in general dental practice. *Br Dent J* 2004; 196:701-3.

37. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002; 29(11):1115-9.
38. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2):e139-43.
39. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*. 2008;14(7):582-90.
40. Shay K, Truhlar MR, Renner RP: Oropharyngeal candidosis in the older patient. *J Am Geriatr Soc* 1997; 45:863-70.
41. Sims CR, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Archives of Medical Research* 2005; 36(6): 660–71.
42. Song YG, Lee SH. Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on *Candida* biofilm of denture surface. *Archives of Oral Biology* 76 (2017) 1–6.
43. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W: Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol* 2001; 90:172-9.
44. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nut* 1998; 52: 899-907.
45. Sutula, J., Coulthwaite, L., Thomas, L. and Verran, J. The effect of a commercial probiotic drink on oral microbiota in healthy complete denture wearers. *Microb Ecol Health Dis* 2012; 23:18404.
46. ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, et al: Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res* 2009; 88: 105-115.
47. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP: Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007; 52:1200-08.
48. Tuohy K, Pinart GM, Jones M, Hoyles L, McCartney AL, Gibson G. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *Anglais* 2007; 102: 1026-32.
49. Ujaoney S, Chandra J, Faddoul F, Chane M, Wang J, Taifour L, et al. In Vitro Effect of Over-the-Counter Probiotics on the Ability of *Candida Albicans* to Form Biofilm on Denture Strips. *The Journal of Dental Hygiene* 2014;88(3):183-89.

50. van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013; 70(19): 3545–70.
51. 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.
52. Webb, B.C., Thomas, C.J., Willcox, M.D., Harty, D.W. and Knox, K.W. (1998) *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J* 1998; 43: 45-50
53. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 2011; 3: 1–11.