



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

ISABELA ARAGUÊ CATANOZE

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

Araçatuba - SP

2018

ISABELA ARAGUÊ CATANOZE

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

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para prova de obtenção de título de Mestre em Ciências Odontológicas - Área de Concentração: Biomateriais.

Orientadora: Profa. Ass. Dra Aimée Maria Guiotti

Coorientadora: Profa. Associada Cristiane Duque

Araçatuba - SP

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C357e Catanoze, Isabela Araguê.
Efeito antagonista de probióticos isolados e comerciais sobre o crescimento de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias / Isabela Araguê
Catanoze. - Araçatuba, 2018
60 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti
Coorientadora: Profa. Cristiane Duque

1. Probióticos 2. Biofilmes 3. *Candida albicans* 4. Resinas acrílicas 5. Estomatite sob prótese I. T.

Black D15

CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Dados
Curriculares*

ISABELA ARAGUÊ CATANOZE

Nascimento: 13/06/1994 – São José do Rio Preto/SP

Filiação: Silvio Catanoze e Mariza Cristina Araguê Gomes Catanoze

(2012 – 2016) Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/ UNESP (Universidade Estadual Paulista)

(2017) Mestrado em Ciências Odontológicas, área de Biomateriais. Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/ UNESP (Universidade Estadual Paulista).

Associações **CROSP** – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo

SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Dedicatória

Dedico este trabalho a **Deus**, acima de tudo, que me guiou e me abençoou em todo o caminho percorrido até o alcance deste título. Obrigada por me dar forças e saúde para continuar, mesmo com algumas dificuldades encontradas.

E aos meus pais **Mariza e Silvio**, por terem me encorajado a seguir esse caminho em busca da minha formação, e sempre estarem presentes em minha vida. Obrigada por não medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos, serei eternamente grata por tudo que fazem e ainda farão por mim. Amo vocês e muito obrigada.

Agradecimientos

Aos meus pais, **Mariza e Silvio**, meus eternos agradecimentos por permitirem que eu tivesse essa oportunidade de cursar uma pós-graduação. Nunca me desampararam e sempre me deram todo o apoio necessário para que eu concluísse esta etapa. Sem vocês, nada disso seria concretizado, se cheguei até aqui foi por vocês e para vocês, e sempre serei grata por tudo isso.

À minha querida orientadora **Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti** nem sei por onde começar. Desde que a escolhi para ser minha orientadora, já havia grande admiração pela profissional e pessoa que é. Acredito que as pessoas não cruzam nosso caminho por acaso, tínhamos que estar juntas por algum tempo. Além de orientadora, foi minha mãe científica. Digo mãe porque se preocupou comigo como se fosse a minha própria. Tive a honra de acompanhar de perto a sua gravidez da Lorena, fico muito feliz de ter tido a oportunidade de participar dessa etapa linda da sua vida. Caminhamos juntas durante todo o meu mestrado, e também teve grande participação no meu processo de amadurecimento, tanto como pessoa quanto profissional. Palavras não expressam a gratidão por tudo que fez por mim, pessoa maravilhosa e profissional dedicada, que sempre admirei desde a época da graduação. Obrigada por ter cruzado meu caminho e ter feito parte dessa etapa da minha vida. Obrigada por ter se preocupado comigo, não só como aluna, mas como pessoa. Obrigada por ter feito o trabalho acontecer me ajudando no que foi preciso, não medindo esforços, mesmo diante da crise e a falta de verbas. Foi um prazer ser sua orientada, cresci muito nessa fase e você fez parte disso. Saiba que sempre terá uma aluna que te admira muito, e tem como inspiração ser pelo menos um pouquinho do que você é. A vida é feita de incertezas, independente do caminho que irei seguir, sempre a levarei com muito carinho no coração por onde eu for, sendo um exemplo a ser seguido, tanto como profissional quanto ser humano.

À minha querida coorientadora **Profa. Dra. Cristiane Duque**, muito obrigada por tudo. Pessoa incrível que tive a honra de conviver nesses dois anos, excelente profissional e grande pesquisadora. Obrigada por tirar minhas dúvidas sobre os procedimentos do laboratório, não medindo esforços para que realizássemos o trabalho, tanto concedendo materiais a serem utilizados quanto à metodologia, e também por ter paciência e me dar todo o apoio necessário para que a pesquisa fosse desenvolvida. Sempre a levarei com muito carinho e admiração por onde for.

Ao **Prof. Dr. Robson Frederico Cunha**, grande mestre que tive a honra de conviver nesse período do mestrado. Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de participar da Bebê Clínica nesses dois anos, pela disciplina que ministrou de Metodologia de Ensino que somou muito aprendizado na minha vida acadêmica e também por ter feito parte do meu início no Espiritismo. Obrigada pela convivência e ensinamentos tanto na faculdade quanto no centro. Seus conhecimentos e sua postura como pessoa é invejável, uma grande inspiração para a vida pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Douglas Monteiro**, obrigada por ter aceitado meu convite para ser banca da minha defesa de mestrado. Grande profissional que tive a honra de conhecer, e fico muito feliz em ter sua presença nesse momento tão importante para mim.

À **Profa. Dra. Natália Leal Vizoto**, agradeço muito por ter aceitado o convite para ser banca da minha defesa de Mestrado. É um prazer tê-la comigo nesse dia especial e fico muito feliz por isso.

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique dos Santos**, obrigada pela participação na banca do meu Exame Geral de Qualificação, contribuindo com sugestões para o nosso trabalho. Obrigada também pela convivência nos laboratórios de Materiais Dentários, grande professor que fez parte da minha formação que admiro muito.

À **Profa. Maria Cristina Rosifini**, obrigada pela companhia ao longo dos laboratórios de Materiais Dentários. Sempre muito querida e disposta à ajudar no que fosse preciso.

À **Profa. Dra. Denise Pedrini** obrigada pela participação na banca do meu Exame Geral de Qualificação contribuindo com sugestões para o meu trabalho. Admiro muito a senhora.

Ao **Bruno Guandalini Cunha**, muito obrigada por ter me ensinado grande parte do que aprendi no laboratório de microbiologia. Devo a você muita coisa do que sei fazer na prática dos experimentos. Obrigada por ter tido paciência, sentado comigo e me explicado cada passo da metodologia para os experimentos, participando da minha evolução. Ganhei um amigo que sempre lembrarei com muita gratidão.

À **Gabriella Queiroz Costa**, minha companheirinha de pesquisa que acabou se transformando em uma grande amiga. Obrigada por tudo, trabalhamos juntas para que a pesquisa fosse concluída e agora vemos que todo o esforço valeu a pena. Você é muito especial e sabe disso.

À **Heloísa Silva**, obrigada pela ajuda para a realização da pesquisa. Também trabalhou comigo para que os experimentos fossem realizados e se tornou uma grande amiga. Te desejo muito sucesso sempre.

Aos meus amigos da pós-graduação **Caio Sampaio, Daniela Alvim, Heitor Ceolin, Igor Zen e Vanessa Rodrigues**, seria difícil escrever para cada um de vocês separadamente aqui, de tanta coisa para falar. Fiz muitas amizades durante o mestrado que nem imaginava que se tornariam tão especiais para mim. No início dessa fase tudo era muito novo, mas com a presença de vocês se tornou bem mais fácil. Sou muito grata por ter conhecido cada um de vocês, pessoas incríveis e amigos maravilhosos que eu levarei sempre comigo. Estivemos juntos durante esses dois anos em todos os momentos, de alegria, de incertezas e, com

certeza, virão mais muitos outros momentos de conquistas ao longo da vida. Obrigada por tudo meus queridos amigos. Meus pesquisadores preferidos.

À minha grande amiga irmã **Vanessa Gonçalves**, obrigada por ter feito parte desta etapa da minha vida mesmo à distância. Você é muito importante e insubstituível, amizade que foi construída dentro da UNESP e que carrego dentro do meu coração com muito carinho e consideração para a vida inteira. Eterna gratidão por ter encontrado uma amiga verdadeira ao longo da minha formação. A saudade sempre aperta, mas a distância não é nada, estaremos sempre juntas e comemoraremos muitas conquistas que virão, se Deus quiser.

À minha amiga **Amanda Luz**, amiga mais animada, obrigada por ter feito parte desta etapa da minha vida, mesmo à distância. Nossas conversas são sempre as mais engraçadas, me deixando feliz em qualquer circunstância. Tenho um carinho imenso por você, amizade que levarei para a vida toda.

À minha amiga **Marina Cury** obrigada pela amizade e pelo companheirismo, desde a época da graduação. Nunca esquecerei do dia em que me acompanhou até o médico quando estava doente e longe da família, me ajudando no que precisei. Muito grata por ter você nesses anos.

À minha amiga **Aline Trevizan** obrigada pela amizade e pelo companheirismo, sendo minha dupla na maioria das disciplinas durante a graduação.

À minha grande e querida amiga **Carolina Nakata**. Mesmo com a correria do dia a dia, sempre torcemos uma pela outra, amizade de longa data que permanece intacta até hoje. Obrigada pelas conversas sobre o futuro, sempre estaremos juntas nas nossas conquistas que ainda estão por vir.

À minhas amigas de apartamento **Betina Commar e Luara Colombo** que estiveram presentes desde o momento da matrícula até o fim da pós-graduação, uma nova família que construí em Araçatuba e que fizeram eu aprender um pouquinho do que é morar longe de

casa. Obrigada por terem sido companheiras do começo ao fim, aprendi muito com cada uma de vocês, levarei vocês sempre no coração independente do nosso caminho a partir de agora.

Às minhas amigas de infância do ballet **Ana Cristina Alves, Beatriz Macedo, Lanatiele Volpini e Maria Júlia Folchini** obrigada pelo apoio. Mesmo com a distância, sempre torceram por mim para que eu chegasse até aqui. Minhas eternas bailarinas tão queridas. Levo sempre comigo no coração.

Aos meus **tios, avós e primos**, muito queridos, que também me apoiaram em todas as etapas da minha vida desde sempre, me incentivando a sempre crescer. Obrigada por tudo.

À **Emily Silva** meus agradecimentos pela realização da estatística deste trabalho, desejo a você muito sucesso e muitas conquistas em sua vida.

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

OXIMED de São José do Rio Preto.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, muito obrigada.

Epígrafe

*Ontem passado.
Amanhã futuro.
Hoje agora.
Ontem foi.
Amanhã será.
Hoje é.
Ontem experiência adquirida.
Amanhã lutas novas.
Hoje, porém, é a nossa hora de fazer e de construir.*

Chico Xavier

*Resumo Geral em
Português*

CATANOZE, I.A. **Efeito antagonista de probióticos isolados e comerciais sobre o crescimento de *Candida albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias.** 2018. Trabalho de dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO GERAL

A estomatite protética é 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 espécies 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. O objetivo desta pesquisa foi avaliar in vitro, a influência de diferentes probióticos isolados e dois probióticos comerciais na inibição do crescimento 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 (Ra). 90 amostras de RAAT foram divididas em 9 grupos: GI- controle negativo (*Candida albicans* sem probiótico); GII- *Candida albicans* + *Lactobacillus casei*; GIII- *Candida albicans* + *Lactobacillus rhamnosus*; GIV- *Candida albicans* + *Lactobacillus helveticus*; GV- *Candida albicans* + *Bifidobacterium lactis*; GVI- *Candida albicans* + *Bifidobacterium longum*; GVII- *Candida albicans* + *Lactobacillus fermentum*; GVIII- *Candida albicans* + Microbiome e GIX- *Candida albicans* + Prolive. Biofilmes de *C. albicans* foram formados sobre as superfícies das amostras de RAAT na presença dos probióticos, exceto para o grupo GI. Para a quantificação do biofilme, o número de células cultiváveis nas amostras de RAAT foi avaliado por contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). A alteração de superfície das amostras foi avaliada em rugosímetro (Ra - μm), antes e após a interação com os biofilmes. Os dados obtidos de UFCs e rugosidade foram submetidos à análise estatística (ANOVA 1 fator e 2 fatores medidas repetidas, respectivamente, seguidos do Teste de Tukey, $p \leq 0.05$). A rugosidade de superfície da RAAT foi diminuída após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos, exceto para o grupo GVII, GVIII e GIX. Houve diminuição estatisticamente significativa dos valores de Log (UFC/mL) de quatro probióticos isolados associados à *C. albicans* (*B. lactis*, *B. longum*, *L. casei*, *L. helveticus*) e do probiótico Prolive associado à *C. albicans*, quando comparados ao grupo controle (GI). As espécies *B. longum* e *L. casei* apresentaram os maiores valores de redução de UFC/mL de *C. albicans*. Conclui-se que de maneira geral, os probióticos testados promoveram um efeito antagonista sobre

o crescimento de *C. albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias e a rugosidade da RAAT foi diminuída após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos.

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

Resumo Geral em
Inglês

CATANOZE, I.A. **Antagonist effect of isolated and commercial probiotics on the growth of *Candida albicans* on acrylic resin surface for dental prostheses.** 2018. Master's Degree thesis - Faculty of Dentistry, São Paulo State University, 2018.

GENERAL ABSTRACT

Prosthetic stomatitis is associated with microbial colonization of the prosthesis base, favored by poor hygiene of the species and the high level of *Candida spp.* in the oral cavity. *Candida albicans* is a fungal species most commonly associated with oral pathology, usually treated with antifungal. Indiscriminate use can cause damage to species and side effects to individuals. Thus, it is desirable to promote health through natural or alternative therapies, such as the use of probiotic microorganisms. The objective of this research was to evaluate in vitro, the influence of different probiotics and two commercial probiotics on the inhibition of *C. albicans* biofilm growth in thermally activated acrylic resin (RAAT) for prosthetic base and to verify if biofilm byproducts would have potential alteration of the surface of RAAT (Ra) samples. 90 RAAT samples were divided into 9 groups: GI- negative control (*Candida albicans* without probiotic); GII- *Candida albicans* + *Lactobacillus casei*; GIII- *Candida albicans* + *Lactobacillus rhamnosus*; GIV- *Candida albicans* + *Lactobacillus helveticus*; GV- *Candida albicans* + *Bifidobacterium lactis*; GVI- *Candida albicans* + *Bifidobacterium longum*; GVII- *Candida albicans* + *Lactobacillus fermentum*; GVIII- *Candida albicans* + Microbiome and GIX- *Candida albicans* + Prolive. Biofilms of *C. albicans* were formed on the surfaces of RAAT samples in the presence of probiotics, except for GI group. For biofilm quantification, the number of cultured cells in the RAAT samples was evaluated by counting colony forming units (CFUs). The surface change of the samples was evaluated in a rugosimeter (Ra - μm), before and after the interaction with biofilms. The data obtained from CFUs and roughness were submitted to statistical analysis (ANOVA, followed by Tukey's test, $p \leq 0.05$). The surface roughness of RAAT was decreased after exposure to different microbial biofilms, except for the GVII, GVIII and GIX groups. There was a statistically significant decrease in the log values (CFU / mL) of four probiotic isolates associated with *C. albicans* (*B. lactis*, *B. longum*, *L. casei*, *L. helveticus*) and Prolive probiotic associated with *C. albicans*, when compared to the control group (GI). The species *B. longum* and *L. casei* had the highest values of CFU / mL reduction of *C. albicans*. It is concluded that probiotics tested promoted an antagonistic effect on the growth of *C. albicans* on acrylic resin surface

for dental prostheses and RAAT roughness was decreased after exposure to different microbial biofilms.

Keywords: Probiotics, Biofilms, *Candida albicans*, Acrylic resins, Denture stomatitis

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Valores médios (desvio padrão) da contagem microbiana de <i>C. albicans</i> em Log (UFC/mL) obtidos nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos isolados	36
Tabela 2 -	Valores médios (desvio padrão) da contagem microbiana de <i>C. albicans</i> em Log (UFC/mL) obtidos nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos comerciais.	39
Tabela 3 -	Análise de Variância (ANOVA) medidas repetidas, com dois fatores de rugosidade da RAAT, exposta a diferentes biofilmes microbianos	41
Tabela 4 -	Valores médios (\pm desvio padrão) de rugosidade da RAAT (Ra - μm), exposta a diferentes biofilmes microbianos.	42
Tabela 5 -	Análise de Variância (ANOVA) medidas repetidas, com dois fatores de rugosidade da RAAT, exposta a diferentes biofilmes microbianos.	42
Tabela 6 -	Valores médios (\pm desvio padrão) de rugosidade da RAAT (Ra - μm), exposta a diferentes biofilmes microbianos.	43

Lista de Gráficos

- Gráfico 1 - Contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos isolados (teste de Tukey ($p \leq 0.05$)). 37
- Gráfico 2 - Contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes de probióticos isolados formados nas amostras de RAAT, na presença de *C. albicans* e seus respectivos controles (teste de Tukey ($p \leq 0.05$)). 38
- Gráfico 3 - Contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos comerciais (teste de Tukey ($p \leq 0.05$)). 39
- Gráfico 4 - Contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes de probióticos comerciais formados nas amostras de RAAT, na presença de *C. albicans* e seus respectivos controles (teste de Tukey ($p \leq 0.05$)). 40

Sumário

Introdução	27
Materiais e Métodos	29
Análise Estatística	35
Resultados	36
Discussão	43
Conclusão	47
Referências bibliográficas	48
Anexo A	55
Anexo B	57
Anexo C	58
Anexo D	59

Esta dissertação segue o guia de preparação de manuscritos do The Journal of Prosthetic Dentistry (JPD), disponível no site:

<https://www.thejpd.org/content/authorinfo#idp1617152>

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

RESUMO

Declaração do problema. Das várias propriedades de virulência de *C. albicans*, a formação de biofilme em superfícies acrílicas de próteses desempenha um papel crítico para a manutenção da higiene oral, culminando com o desenvolvimento de infecções. Biofilmes representam nichos, 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. A este respeito, os probióticos surgem como alternativa potencial na redução da prevalência de candidíase oral.

Objetivo. Avaliar in vitro a influência de diferentes probióticos vivos isolados, normalmente utilizados em produtos alimentícios e de dois suplementos probióticos comerciais, na inibição do crescimento do biofilme de *Candida 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.

Materiais e Métodos. 90 amostras de RAAT foram divididas em 9 grupos: GI- controle negativo (*Candida albicans* sem probiótico); GII- *Candida albicans* + *Lactobacillus casei*; GIII- *Candida albicans* + *Lactobacillus rhamnosus*; GIV- *Candida albicans* + *Lactobacillus helveticus*; GV- *Candida albicans* + *Bifidobacterium lactis*; GVI- *Candida albicans* + *Bifidobacterium longum*; GVII- *Candida albicans* + *Lactobacillus fermentum*; GVIII- *Candida albicans* + Microbiome (*Lactobacillus reuteri*) e GIX- *Candida albicans* + Prolive (*Lactobacillus acidophilus*). 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). A rugosidade (Ra - μm) de superfície das amostras de RAAT foi analisada em rugosímetro, antes e após a formação dos biofilmes. Os dados obtidos de UFCs e rugosidade foram submetidos à análise estatística (ANOVA, seguido do Teste de Tukey, $p \leq 0.05$).

Resultados. A rugosidade de superfície da RAAT foi diminuída após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos, exceto para os grupos GVII, GVIII e GIX. Houve uma diminuição estatisticamente significativa dos valores de Log (UFC/mL) de quatro probióticos isolados associados à *C. albicans* (*B. lactis*, *B. longum*, *L. casei*, *L. helveticus*) e do probiótico comercial Prolive associado à *C. albicans*, quando comparados ao grupo controle (GI). As espécies *B. longum* e *L. casei* apresentaram os maiores valores de redução de UFC/mL de *C. albicans*.

Conclusão. De maneira geral, os probióticos testados promoveram um efeito antagonista sobre o crescimento de *C. albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias e a rugosidade da RAAT foi diminuída após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos.

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

A resistência dos microrganismos aos medicamentos e os efeitos colaterais dos antifúngicos, restringem seu uso como agentes profiláticos de longo prazo para infecções fúngicas. Este estudo deixa evidente a ação promissora dos probióticos contra biofilme de *C. albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias. 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.

INTRODUÇÃO

O crescimento da população idosa é uma realidade no cenário brasileiro e um fenômeno mundial, conseqüentemente 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.¹ Em virtude do processo de envelhecimento acarretar alterações fisiológicas e ser agravado por certas condições patológicas predisponentes, os idosos tendem a perder a capacidade funcional para as atividades diárias sendo a higiene bucal uma delas.²

Alguns fatores associados, como o declínio da resposta imunológica, a higiene bucal deficiente e a diminuição da salivação pelo uso constante de medicamentos favorecem a proliferação de leveduras, contribuindo para a proliferação de *Candida spp.* na cavidade bucal de idosos.³⁻⁶ 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.⁵

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.⁷⁻⁹ *Candida albicans* é a espécie fúngica mais comumente associada à estomatite protética, sendo responsável por cerca de 24-75% dos casos de infecção.¹⁰⁻¹⁴ 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.^{3,15-17}

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 destes microrganismos aos agentes

antimicrobianos.^{18,19} 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.²⁰ 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, além de promoverem uma melhora no sistema gastrointestinal quando consumidos em alimentos, efeito já extensivamente estudado sobre a flora intestinal.²¹⁻²⁵ Os probióticos estão disponíveis como suplementos dietéticos e são comumente adicionados aos alimentos como iogurte, sucos, queijos, leite e produtos de soja, incluindo uma larga variedade de microrganismos, como os *Lactobacillus* e os *Bifidobacterium*. 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.³

Das várias propriedades de virulência de *C. albicans*, a formação de biofilme em superfícies acrílicas desempenha um papel crítico para a manutenção da higiene oral.^{26,27} Biofilmes representam nichos exclusivos, onde os microrganismos são envoltos em uma matriz extracelular, que os protegem da ação de agentes antimicrobianos, da saliva e da própria resposta imune do hospedeiro.^{28,29} A este respeito, os probióticos surgem como alternativa potencial na redução da prevalência de candidíase oral.^{3,30,31}

Alguns estudos têm mostrado resultados promissores sobre a ação dos probióticos contra as espécies de *Candida* presentes na cavidade oral.^{3,32-34} 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. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram

avaliar *in vitro* a influência de diferentes probióticos vivos isolados, normalmente utilizados em produtos alimentícios e de dois suplementos probióticos comerciais, na inibição do crescimento do biofilme de *Candida 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.

As hipóteses nulas deste estudo foram as de que os probióticos vivos e comerciais utilizados não inibiriam o crescimento de *C. albicans* em amostras de RAAT e não alterariam a superfície das amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Confecção das amostras em resina acrílica ativada termicamente (RAAT)

(ANEXO A)

Foram confeccionadas 90 amostras de RAAT (VipiCril Plus, VIPI Produtos Odontológicos), utilizando-se uma matriz metálica 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.). Em seguida o conjunto lâmina de vidro e matriz metálica foi incluído em mufla (Vipi STG, VIPI Produtos Odontológicos). 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), seguindo a proporção de 100 g de pó para 30 mL de água, espatulado por 1 minuto e vertido sob vibração constante. 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). A contra-mufla foi posicionada e, sobre a superfície desta última lâmina de vidro foi vertido gesso pedra tipo III. Em seguida, a mufla

foi levada à prensa hidráulica de bancada (VH, Midas Dental Produtos Ltda) sob pressão constante de 1000 Kgf por 2 minutos. 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). A RAAT 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, em que a mufla foi colocada em recipiente com água fria e a temperatura foi elevada para 65 °C, em 30 minutos, permanecendo nesta temperatura por 1h. Após este período, a temperatura da água foi elevada para 100 °C, em 30 min, permanecendo nesta temperatura por mais 1h. Após a polimerização da resina, e o resfriamento da mufla, a mesma foi aberta e as amostras foram removidas e submetidas ao polimento em uma politriz universal semiautomática (Arotec S.A. Ind Com), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (400, 600, 800 e 1200 - Buehler), sendo posteriormente finalizadas com solução diamantada em disco de feltro. 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;). 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.

Avaliação da rugosidade de superfície (Anexo B)

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-400; Mitutoyo Corp.), sendo

considerada a faixa de 0,02 a 0,05 μm , ideal no período inicial. As amostras de RAAT foram posicionadas individualmente no rugosímetro com a superfície submetida à análise sempre voltada para cima, sendo executadas três leituras paralelas para mensurar a rugosidade de superfície (Ra) inicial. A extensão de cada leitura foi de 2.4 mm, com cut-off de 0.8 mm).^{35,36} A velocidade da leitura foi de 0.5mm/seg. Os valores de rugosidade iniciais foram obtidos pela média aritmética e dados em micrometros. 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), para serem posteriormente submetidas à adesão e formação dos biofilmes de *C. albicans*, e *C. albicans* + probióticos. Novas leituras foram realizadas após a interação com os biofilmes, a fim de verificar se os subprodutos dos mesmos teriam um potencial de alteração da superfície das amostras de RAAT.

Determinação dos grupos do estudo (Anexo C)

As seguintes cepas isoladas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) foram utilizadas neste estudo: *Candida albicans* (ATCC 26790); *Lactobacillus casei* (ATCC 393); *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 9595); *Lactobacillus helveticus* (ATCC 12046); *Bifidobacterium lactis* (ATCC 7503); *Bifidobacterium longum* (ACCT 7502) e *Lactobacillus fermentum* (ATCC 9338). Essas cepas microbianas foram fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Dois suplementos probióticos comerciais isolados foram utilizados neste estudo, sendo eles: Microbiome Plus (Longhill Interprises Limited) à base de *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 30242) e Prolive (Aché) à base de *Lactobacillus acidophilus* (LA 14).

As 90 amostras de RAAT foram divididas nas placas de 24 poços, em 9 grupos (n=5), perfazendo dois ensaios independentes (n=10 no total): GI - controle negativo

(*Candida albicans* sem probiótico); GII- *C. albicans* + *L. casei*; GIII- *C. albicans* + *L. rhamnosus*; GIV- *C. albicans* + *L. helveticus*; GV- *C. albicans* + *B. lactis*; GVI- *C. albicans* + *B. longum*, GVII- *C. albicans* + *L. fermentum*, GVIII- *C. albicans* + Microbiome, GIX – *C. albicans* + Prolive.

Curvas de crescimento dos microrganismos

As cepas dos probióticos isolados previamente congeladas em freezer -80 °C foram reativadas em meios de cultura específicos. Os probióticos da espécie *Bifidobacterium* cresceram em meio TOS-muporicina ágar (Merck KGaA) e os probióticos da espécie *Lactobacillus* cresceram em meio Rogosa ágar (M.R.S. AGAR De Man, Rogosa, Sharpe; Oxoid Companies), mais ácido acético a 99%, por 48 horas em estufa de CO₂ a 5%. A cepa de *C. albicans* foi reativada em meio Sabouraud Dextrose Ágar (ASD; Difco) 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 caldo Brain Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories) com 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 com 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 foram plaqueadas em meios específicos para obtenção dos valores de Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL). Foram definidos os valores de densidade óptica (DO) entre 0.3 a 0.4 para *C. albicans* (10⁶ UFC/mL) e entre 0.9 e 1.0 (10⁹ UFC/mL) para os probióticos.

Ensaio de biofilme (ANEXO D)

- Cepas e condições de crescimento

Após o conhecimento da DO dos microrganismos, estabelecida por curva de crescimento, iniciou-se os testes de ensaio de biofilme. Os *Lactobacillus* foram descongelados e repicados em Rogosa Ágar; os *Bifidobacterium* em meio TOS-muporicina 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 1% de glicose e *C. albicans* foi inoculada em 5 mL do meio caldo Sabouraud Dextrose e então, mantidos em estufa de CO₂ por 24 horas, a 37 °C.³⁷ Para realizar a reativação das cepas dos probióticos comerciais, foi dissolvido o comprimido utilizando 20 mL de meio BHI caldo suplementado com 1% de glicose sob agitação.

Após o período de incubação foram retirados 500 µL do overnight de *C. albicans* e adicionados em um tubo novo, contendo 5 mL de caldo Sabouraud Dextrose para crescimento de células novas e obtenção da DO entre 0.3 e 0.4 nm, como estabelecido nas curvas de crescimento. Por volta de 2 a 3 horas depois, a DO foi atingida e então foi feito o plaqueamento para posterior contagem de colônias. Foram retirados 3 mL da cultura e colocados em dois microtubos (1.5 mL em cada) para realizar a centrifugação a 8000 rpm (Combi 514R; Hanil) por 5 min, e obtenção do 'pellet' de *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 de *C. albicans* para 18 mL de saliva artificial).

A saliva artificial foi manipulada tendo em sua composição, para cada 1 litro de água deionizada, os seguintes ingredientes: 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).

- 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 (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.

Enquanto as amostras estavam na agitadora, foi realizada a leitura da DO 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 DO entre 0.9 e 1.0.

Após duas horas de aderência inicial de *C. albicans*, a saliva artificial foi retirada e 1 mL de cada probiótico (10^9 células/ml em BHI + 1% de glicose) foi retirado dos tubos da DO 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.

- Quantificação das células cultiváveis

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). Para recuperação de células bacterianas e fúngicas sobre a superfície das amostras, cada amostra foi retirada do poço com o auxílio de uma pinça estéril e introduzida em um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução PBS (pH 7, 0.1 mol L⁻¹) para que estes tubos fossem levados à agitação em cuba ultrassônica (Ultracleaner 1400; UNIQUE) por 10min, seguido de agitação em vórtex (AP 56; Phoenix) durante 1min.

Em seguida, 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 mol L⁻¹) foram plaqueadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco) com 50µg/mL de cloranfenicol, para contagem de colônias de *C. albicans*. Para contagem das colônias de probióticos dos grupos controles, as espécies *Bifidobacterium* foram plaqueadas em meio TOS-muporicina ágar (Merck KGaA) com 20µg/mL de anfotericina B e os probióticos da espécie *Lactobacillus* plaqueados em meio Rogosa ágar (M.R.S. AGAR De Man, Rogosa, Sharpe; Oxoid Companies), mais ácido acético com 20µg/mL de anfotericina B. Para os probióticos comerciais, foi feito o plaqueamento em BHI ágar (BHI; Difco Laboratories) com 20µg/mL de anfotericina B. Após 18-24 h de incubação das placas para crescimento de *C. albicans* e 48h para crescimento das espécies isoladas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e dos probióticos comerciais em estufa de CO₂, a 37 °C, o número de UFCs/mL foi contado manualmente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de contagem microbiana obtidos para o ensaio de viabilidade celular foram convertidos em Log (UFC/mL). Os mesmos foram analisados quanto a sua homogeneidade (Shapiro Wilks), a fim de determinar se provinham ou não de uma distribuição normal.

Como a distribuição dos dados foi paramétrica, a análise de variância (ANOVA 1 fator) foi aplicada, seguido do teste de Tukey-Kramer ($\alpha=.05$). Para os dados obtidos no teste de rugosidade (Ra), como os mesmos apresentaram uma distribuição normal, a análise de variância (ANOVA dois fatores), medidas repetidas foi aplicado, seguido do teste de Tukey-Kramer ($\alpha=.05$), utilizando-se o programa IBM SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

RESULTADOS

- Resultados da contagem de UFCs em Log

Na tabela 1 e gráfico 1 abaixo, estão representados os resultados médios da contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos isolados.

Tabela 1 - Valores médios (desvio padrão) da contagem microbiana de *C. albicans* em Log (UFC/mL) obtidos nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos isolados

BIOFILMES	Log (UFC/mL) Média/DP	Redução em Log (%)*
<i>GI- C. albicans</i>	6.29/ (0.21) a	-
<i>GII- C. albicans + L. casei</i>	5.07/ (0.57) c	1.22 (19.4%)
<i>GIII- C. albicans + L. rhamnosus</i>	5.83/ (0.17) a	0.46 (7.31%)
<i>GIV- C. albicans + L. helveticus</i>	5.33/ (0.40) b,c	0.96 (15.26%)
<i>GV- C. albicans + B. lactis</i>	5.77/ (0.28) b	0.52 (8.27%)
<i>GVI- C. albicans + B. longum</i>	4.94/ (0.29) c	1.35 (21.46%)
<i>GVII- C. albicans + L. fermentum</i>	5.88/ (0.48) a	0.41 (6.52%)

Letras diferentes mostram diferença entre os grupos (Teste de Tukey, $p \leq 0.05$)
* % de redução em relação à média do controle de *C. albicans*

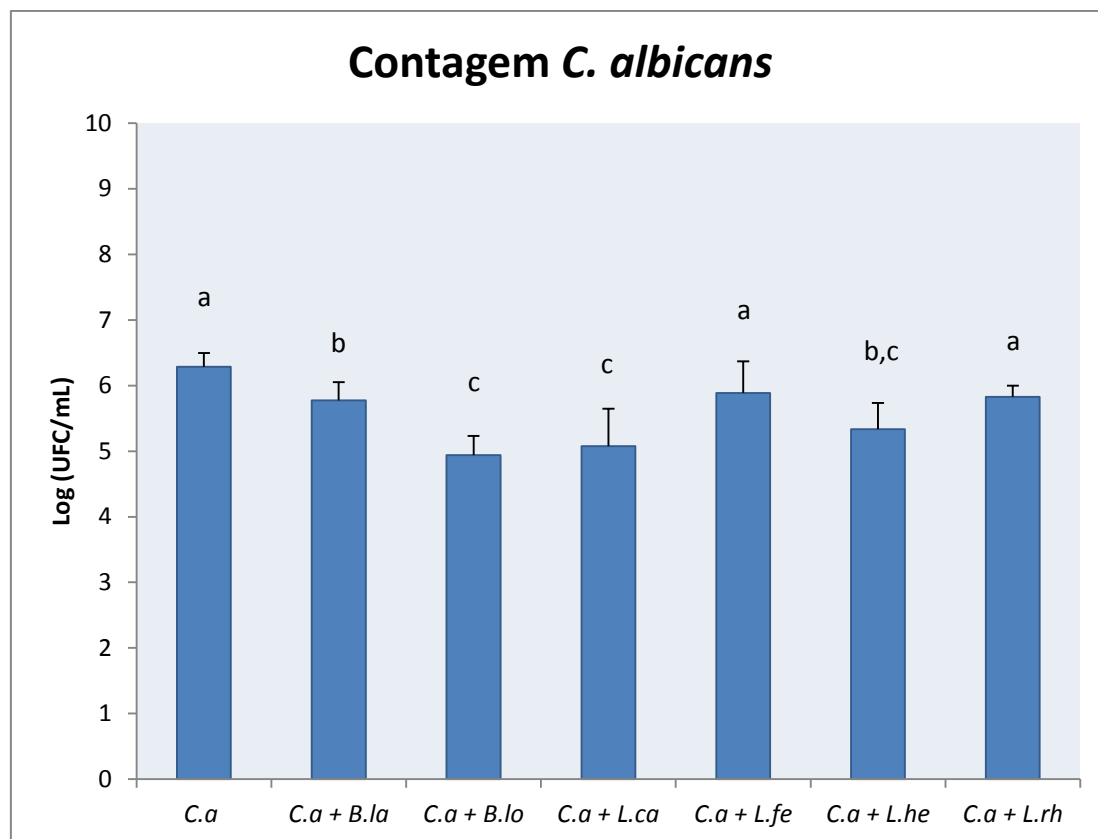


Gráfico 1 - Contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos isolados (teste de Tukey ($p \leq 0.05$)). As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0.05$). C.a, *Candida albicans*; B. la, *Bifidobacterium lactis*; B.lo, *Bifidobacterium longum*; L.ca, *Lactobacillus casei*; L.fe, *Lactobacillus fermentum*, L.he, *Lactobacillus helveticus*; L.rh, *Lactobacillus rhamnosus*.

Foi possível notar na Tabela 1 e Gráfico 1, que houve diferença estatística significativa entre os valores de Log (UFC/mL) de quatro probióticos associados à *C. albicans* (*B. lactis*, *B. longum*, *L. casei*, *L. helveticus*) e o grupo controle de *C. albicans*. Na quantificação do biofilme em Log, *C. albicans* (GI- controle) apresentou uma média de 6.2 (UFC/mL) nas amostras de RAAT. As menores contagens de UFC/mL foram as obtidas pelos biofilmes formados na presença de *B. longum*, com valor médio de 4.94 (UFC/mL), seguido do *L. casei*, com valor médio de 5.07 (UFC/mL). Não houve redução estatisticamente significativa em relação ao controle quando os probióticos *L. fermentum* e *L. rhamnosus* foram associados à *C. albicans*, embora pôde-se notar uma redução numérica.

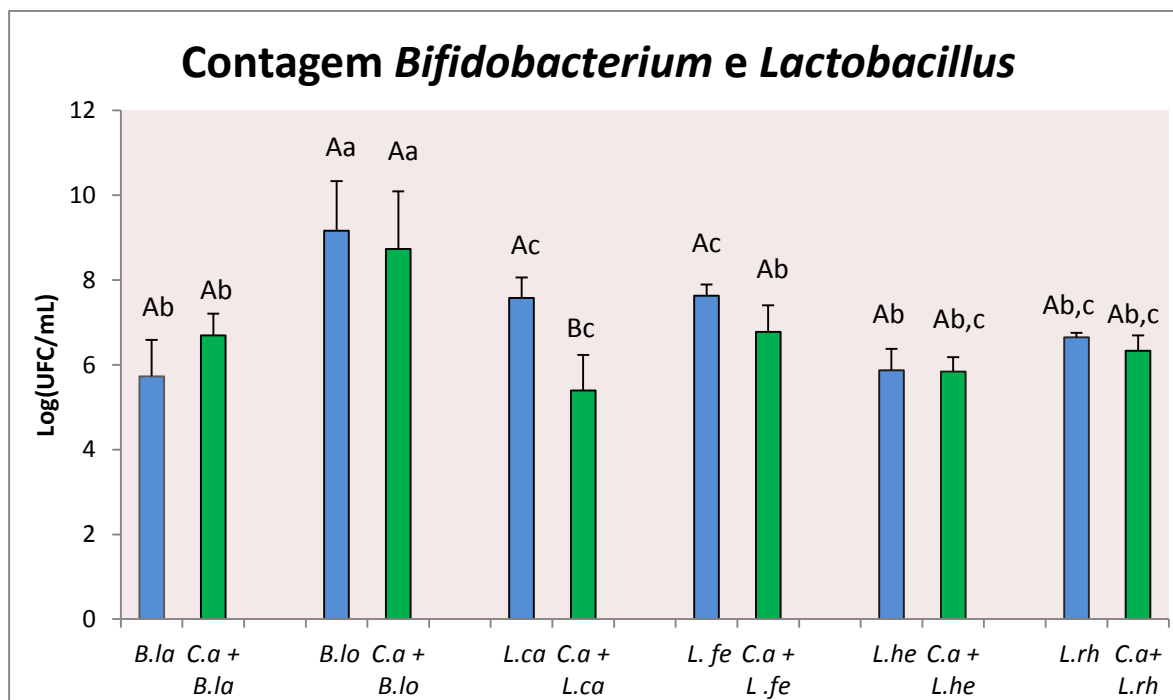


Gráfico 2 - Contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes de probióticos isolados formados nas amostras de RAAT, na presença de *C. albicans* e seus respectivos controles (teste de Tukey ($p \leq 0.05$)). As letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as barras azuis e verdes, para cada probiótico isoladamente. As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as barras azuis entre si ou entre as barras verdes entre si, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). C.a, *Candida albicans*; B. la, *Bifidobacterium lactis*; B.lo, *Bifidobacterium longum*; L.ca, *Lactobacillus casei*; L.fe, *Lactobacillus fermentum*, L.he, *Lactobacillus helveticus*; L.rh, *Lactobacillus rhamnosus*.

Foi possível notar no Gráfico 2, que houve diferença estatística significativa entre os valores de Log (UFC/mL) apenas para o probiótico *L. casei* associado à *C. albicans* e seu respectivo grupo controle, apresentando uma menor contagem de UFC/mL. Este fato sugere que *C. albicans* interferiu na viabilidade celular deste probiótico. O probiótico associado à *C. albicans* que apresentou a maior viabilidade celular foi *B. longum*, sendo estatisticamente diferente dos demais.

Na tabela 2 e gráfico 3 abaixo, estão representados os resultados médios da contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos comerciais.

Tabela 2 - Valores médios (desvio padrão) da contagem microbiana de *C. albicans* em Log (UFC/mL) obtidos nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos comerciais.

BIOFILMES	Log (UFC/mL) Média/DP	Redução em Log (%)*
<i>GI- C. albicans</i>	6.57/ (0.56) a	-
<i>GII- C. albicans</i> + Microbiome	6.33/ (0.50) a	0.24 (3.65%)
<i>GIII- C. albicans</i> + Prolive	5.72/ (0.36) b	0.85 (12.94%)

Letras diferentes mostram diferença entre os grupos (Teste de Tukey, $p \leq 0.05$)
 * % de redução em relação à média do controle de *C. albicans*

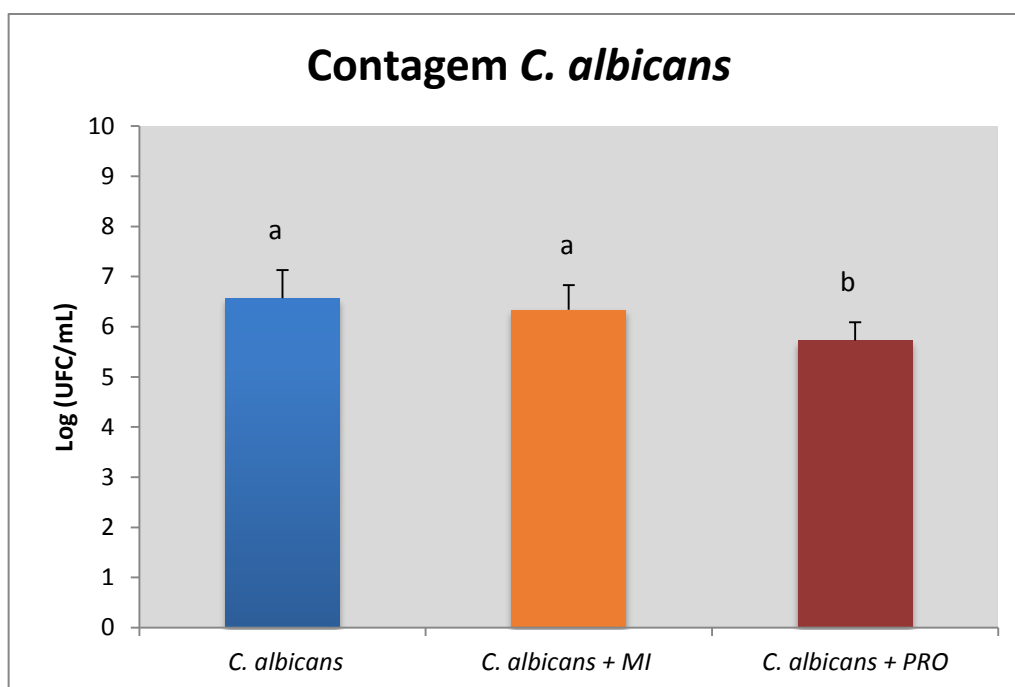


Gráfico 3 - Contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* formados nas amostras de RAAT, na presença dos probióticos comerciais (teste de Tukey ($p \leq 0.05$)). As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). MI, Microbiome; PRO, Prolive.

Foi possível notar na Tabela 2 e Gráfico 3, que houve diferença estatística significativa entre os valores de Log (UFC/mL) do probiótico comercial Prolive associado à *C. albicans* e o grupo controle de *C. albicans*. Na quantificação do biofilme em Log, *C. albicans* (GI- controle) apresentou uma média de 6.57 (UFC/mL) nas amostras de RAAT. A menor contagem de UFC/mL foi obtida pelos biofilmes formados na presença do probiótico comercial Prolive, à base de *L. acidophilus*, com valor médio de 5.72 (UFC/mL). Não houve redução estatisticamente significativa em relação ao controle quando o probiótico comercial Microbiome, à base de *L. reuteri*, foi associado à *C. albicans*, embora pôde-se notar uma redução numérica.

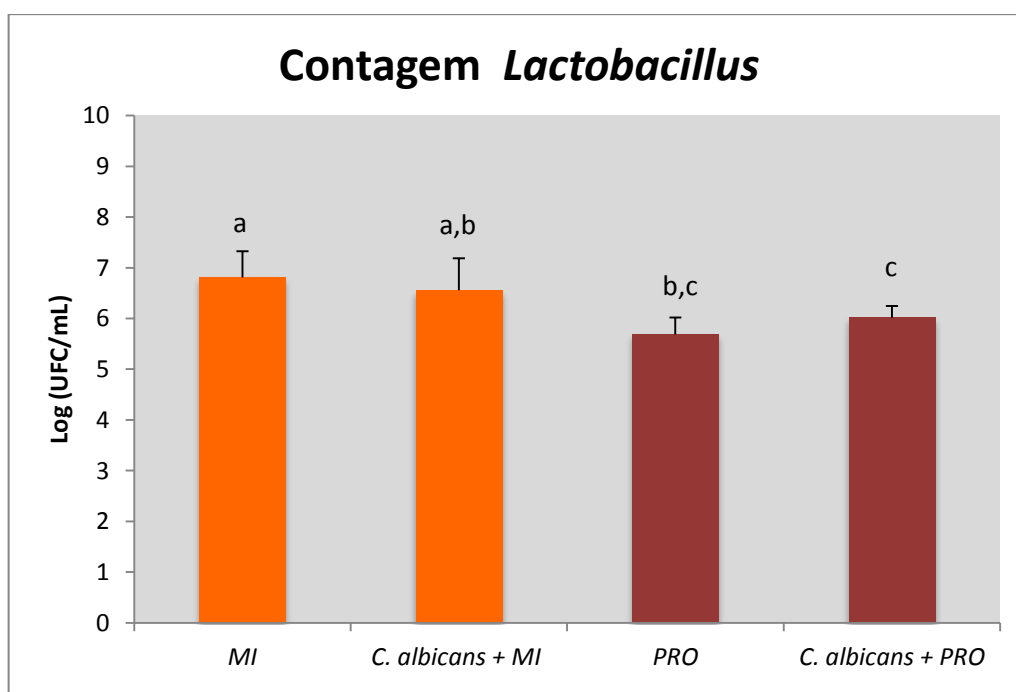


Gráfico 4 - Contagem microbiana (Log UFC/mL) dos biofilmes de probióticos comerciais formados nas amostras de RAAT, na presença de *C. albicans* e seus respectivos controles (teste de Tukey ($p \leq 0.05$)). As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). MI, Microbiome; PRO, Prolive.

Foi observado no Gráfico 4 que houve diferença estatística significativa entre os valores de Log (UFC/mL) dos grupos controles dos probióticos comerciais entre si. Quando associados à *C. albicans*, os probióticos não apresentaram diferença estatística com seu respectivo controle. Este fato sugere que *C. albicans* não interferiu na viabilidade celular destes probióticos comerciais.

Resultados de rugosidade de superfície

-Probióticos Isolados

Nas tabelas abaixo, estão apresentadas a análise de variância ANOVA dois fatores, medidas repetidas e os valores médios de rugosidade (Ra - 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	0.001	6	0.000	0.586	0.740
Entre amostras	0.012	63	0.000		
Período	0.012	1	0.012	100.103	<0.001
Biofilme x Período	0.002	6	0.000	2.212	0.053
Intra amostras	0.007	63	0.000		

$P < 0.05$ denota diferença estatística significante.

Conforme a tabela 3 da ANOVA, houve diferença estatisticamente significativa apenas para o fator período ($p < 0.001$).

Tabela 4 - Valores médios (\pm desvio padrão) de rugosidade da RAAT (Ra - μm), exposta a diferentes biofilmes microbianos.

Biofilme bacteriano	Antes da exposição	Após a exposição
<i>GI- C. albicans</i>	0.038 \pm 0.020 Aa	0.021 \pm 0.004 BCb
<i>GII - C. albicans + L. casei</i>	0.048 \pm 0.011 Aa	0.017 \pm 0.005 Cb
<i>GIII- C. albicans + L. rhamnosus</i>	0.043 \pm 0.012 Aa	0.023 \pm 0.004 Bb
<i>GIV- C. albicans + L. helveticus</i>	0.045 \pm 0.013 Aa	0.022 \pm 0.006 Bb
<i>GV- C. albicans + B. lactis</i>	0.035 \pm 0.020 Aa	0.021 \pm 0.006 BCb
<i>GVI- C. albicans + B. longum</i>	0.037 \pm 0.019 Aa	0.023 \pm 0.007 Bb
<i>GVII- C. albicans + L. fermentum</i>	0.038 \pm 0.018 Aa	0.029 \pm 0.007 Aa
Média geral	0.040	0.022

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem ao nível de 5% de significância ($P \leq 0.05$) pelo teste de Tukey.

Por meio da Tabela 4, é possível observar que a rugosidade da RAAT diminuiu significativamente após exposição aos diferentes biofilmes microbianos, exceto ao biofilme *C. albicans + L. fermentum*.

-Probióticos Comerciais

Tabela 5 - 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	0.002	2	0.001	1.472	0.247
Entre amostras	0.021	27	0.001		
Período	0.000009	1	0.000009	0.037	0.850
Biofilme x Período	0.000	2	0.000	0.573	0.571
Intra amostras	0.007	27	0.000		

$P < 0.05$ denota diferença estatística significante.

Conforme a Tabela 5 é possível observar que a interação entre biofilme analisado e período de análise não interferiu significativamente nos valores de rugosidade da resina acrílica.

Tabela 6 - Valores médios (\pm desvio padrão) de rugosidade da RAAT (Ra - μm), exposta a diferentes biofilmes microbianos.

Biofilme bacteriano	Antes da exposição	Após a exposição
<i>C. albicans</i>	0.034 \pm 0.025 Aa	0.027 \pm 0.010 Aa
<i>C. albicans</i> + Microbiome	0.043 \pm 0.023 Aa	0.044 \pm 0.038 Aa
<i>C. albicans</i> + Prolive	0.029 \pm 0.014 Aa	0.032 \pm 0.013 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.

Por meio da Tabela 6, é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre períodos e grupos analisados.

DISCUSSÃO

A hipótese nula deste estudo de que os probióticos vivos utilizados não inibiriam o crescimento do biofilme de *C. albicans* em amostras de resina acrílica foi rejeitada. Ficou evidente com base nos resultados deste estudo, que os probióticos possuem atividade contra *C. albicans*, comprovando seu efeito antagonista. Dos seis probióticos analisados, quatro inibiram o crescimento do biofilme de *C. albicans* (*B. lactis*, *B. longum*, *L. casei* e *L. helveticus*), apresentando uma redução estatisticamente significativa na contagem de UFC/mL deste fungo, após interação com células destes probióticos. Resultados semelhantes foram obtidos por Song; Lee³⁸, que também comprovaram a atividade de *L. rhamnosus* e *L. casei* 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.³⁹

A atividade antifúngica dos *Lactobacillus* ocorre por dois mecanismos, em primeiro lugar estas espécies 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.⁴⁰ Em segundo lugar, eles produzem vários peptídeos antifúngicos, que podem romper a membrana do fungo ou inativar moléculas do citoplasma.⁴¹ Matsubara et al.⁴² também revelaram que as espécies de *Lactobacillus* ao liberarem metabólitos, inibem o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, interferindo na colonização inicial e na formação de hifas deste fungo.

Estudos clínicos também comprovaram a eficácia do uso de probióticos na redução do nível de infecção por *Candida*. Ishikawa et al.³ realizaram um estudo randomizado duplo-cego, em portadores de próteses totais com a presença de *Candida spp.* na cavidade oral. 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% no grupo placebo, após o período experimental, enquanto que foi reduzido para 16.7% no grupo probiótico. Da mesma forma, 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. Para tanto, os indivíduos do estudo utilizaram o Yakult LB por 20 dias. Após este período, coletas e análises da saliva foram realizadas. A análise

imunológica demonstrou uma redução significativa nos níveis de IgA anti-*Candida* após o uso do Yakult. O uso deste probiótico reduziu significativamente a quantidade de *Candida* na cavidade bucal.⁴³

Kraft-Bodi et al.⁴⁴ realizaram um estudo utilizando pastilhas contendo duas cepas do probiótico *Lactobacillus reuteri*, e demonstrou que quando administrados localmente, os probióticos podem reduzir a prevalência de *Candida* na saliva de pacientes idosos. As cepas de *L. reuteri* são conhecidas por produzir toxinas do tipo peróxido de hidrogênio, a qual pode dificultar o crescimento de *Candida* por inibição seletiva.⁴⁵ Também há a possibilidade de ocorrer interferência sistêmica através de imunomodulação e aumento da produção de IgA.^{46,47}

Assim como os probióticos interferem no crescimento e desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans*, observou-se também no presente estudo, que este fungo interferiu na viabilidade celular dos probióticos, reduzindo estatisticamente a contagem de UFCs/mL de *L. casei*. Este fato sugere que houve uma competição entre as espécies microbianas, por nutrientes, luz ou sítios de adesão.^{48,49} Embora *C. albicans* tenha interferido na viabilidade de *L. casei*, este probiótico se mostrou o segundo mais eficaz quando associado a este fungo, apresentando uma redução microbiana de mais de 1 Log.

A outra hipótese nula deste estudo de que os probióticos vivos utilizados não alterariam a superfície das amostras foi rejeitada. Valores de rugosidade (Ra) próximos ou inferiores a 0.2 μm dificultam a adesão microbiana.⁵⁰ Entretanto, observou-se neste estudo que mesmo com nível de rugosidade média inicial de 0.04 μm para as amostras de RAAT, *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 (energia livre de superfície) e a composição química do material.⁵¹ Quanto

maior a energia livre da superfície, maior será a adesão de microrganismos e, quanto mais hidrofóbica a superfície, menor será a adesão celular.⁵² Outros fatores também devem ser considerados, como a presença de proteínas salivares; dieta rica em carboidratos, dentre outros.^{53,54}

A rugosidade de superfície influencia diretamente na adesão inicial de *Candida spp.* às superfícies, podendo servir de reservatório.^{28,55,56} Estas irregularidades proporcionam uma maior chance destes microrganismos se reterem e se protegerem contra forças de cisalhamento, mesmo durante a limpeza das próteses dentárias. A rugosidade de superfície (Ra) de materiais à base de resina (PMMA) pode variar de 0.02 a 7.6 μm , de acordo com o tipo de polimento.⁵⁷ No presente estudo, os grupos não expostos tiveram um valor de rugosidade superficial média de 0.04 μm ; enquanto que após a exposição aos biofilmes, houve uma alteração da rugosidade média, reduzindo o valor para 0.02 μm . A alteração de superfície do material evidenciada neste estudo pode ser explicada pela ação dos subprodutos do metabolismo dos biofilmes. Estas substâncias, por serem ácidas provavelmente alteraram a matriz resinosa do material, modificando algumas propriedades físicas, como a rugosidade.⁴⁰ Em contrapartida, outro estudo que também avaliou o efeito de biofilmes de *L. rhamnosus* e *L. casei* na superfície de resina, não encontrou alteração estatisticamente significativa na rugosidade do material.³⁸ Diante da gama de fatores citados acima, responsáveis pela colonização microbiana de superfícies, os estudos não conseguem mostrar uma correlação direta entre os valores de rugosidade e a adesão de espécies de *Candida*.⁵⁸

Estas observações são particularmente importantes devido ao aumento da incidência de infecções orais, especialmente por outras espécies de *Candida*, como a *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*, que são resistentes a agentes antifúngicos.⁵⁹ 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.⁶⁰ 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*. Uma das limitações deste estudo foi sua realização in vitro, sendo necessários estudos clínicos futuros para a comprovação dos benefícios destes probióticos e seus possíveis mecanismos de ação na cavidade oral.

CONCLUSÃO

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

- Os probióticos isolados *B. lactis*, *B. longum*, *L. casei* e *L. helveticus* e o probiótico comercial Prolive inibiram o crescimento do biofilme de *C. albicans* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias, apresentando efeito antagonista sobre o crescimento deste fungo;
- *B. longum* e *L. casei* apresentaram os maiores valores de redução de UFC/mL de *C. albicans*;
- a rugosidade da RAAT foi alterada após a exposição aos diferentes biofilmes microbianos, diminuindo seu valor, exceto para o probiótico isolado *L. fermentum*, e os probióticos comerciais Prolive e Microbiome.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Montenegro FLB. A Odontogeriatrics e o envelhecimento saudável. *Rev Assoc Paul Cirur Dent* 2005; 1:6-7.
3. 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; 24:194-9.
4. 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.
5. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16:e139-43.
6. 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.
7. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002; 29:1115-9.
8. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007; 52:1200-8.
9. Shay K, Truhlar MR, Renner RP. Oropharyngeal candidosis in the older patient. *J Am Geriatr Soc* 1997; 45:863-70.
10. Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis: a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J* 1992; 37:107-14.

11. Webb, B.C., Thomas, C.J., Willcox, M.D., Harty, D.W. and Knox, K.W. 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.
12. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10:359-83.
13. 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.
14. 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; 23:377-83.
15. Arkell S, Shinnick A. Update on oral candidosis. *Nurs Times* 2003; 99:52-3.
16. Sims CR, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Archives of Medical Research* 2005; 36:660–71.
17. Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: A review. *Clin Interv in Aging* 2013; 8:1199–208.
18. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 2011; 3:1–11.
19. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 2010; 98:15–25.
20. Oliver RJ, Dhaliwal HS, Theaker ED, et al. Patterns of antifungal prescribing in general dental practice. *Br Dent J* 2004; 196:701-3.

21. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* 2004; 80:516–26.
22. 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.
23. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies rhamnosus prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1735–42.
24. 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.
25. Meijer BJ, Dieleman LA. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases update. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45:S139–44.
26. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* 2008; 14:582-90.
27. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology* 2012; 10:112–22.
28. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* 2001; 80:903-08.
29. 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; 113:755-61.
30. Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuutila H, et al. Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly—a randomized controlled trial. *J Dent Res* 2007; 86:125-30.

31. Mailander-Sanchez D, Wagener J, Schaller M. Potential role of probiotic bacteria in the treatment and prevention of localised candidosis. *Mycoses* 2012; 55:17-26.
32. Li, D., Li, Q., Liu, C., Lin, M., Li, X., Xiao, X, et al. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of Candida-associated stomatitis. *Mycoses* 2014; 57:141-6.
33. 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.
34. 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.
35. 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 Prosthet Dent* 2014; 112:1523-9.
36. 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; 27:176-80.
37. Monteiro, D.R., Feresin, L.P., Arias, L.S., Barão, V.A., Barbosa, D.B., Delbem, A.C. Effect of tyrosol on adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to acrylic surfaces. *Med Mycol* 2015; 53:656-65.
38. Song YG, Lee SH. Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on *Candida* biofilm of denture surface. *Archives of Oral Biology* 2017; 76:1–6.
39. 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; 88:183-9.

40. Gerbaldo GA, Barberis C, Pascual L, Dalcerro A, Barberis L. Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters* 2012; 332:27–33.
41. van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013; 70:3545–70.
42. Matsubara VH, Wang Y, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100:6415-26.
43. 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; 40:960-4.
44. 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.
45. Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008; 14:166–171.
46. Dicksved J, Schreiber O, Willing B, Petersson J Rang S, Phillipson M, et al. *Lactobacillus reuteri* maintains a functional mucosal barrier during DSS treatment despite mucus layer dysfunction. *PLoS One* 2012; 7:e46399
47. Ericson D, Hamberg K, Bratthall G, Sinkiewicz- Enggren G, Ljunggren L. Salivary IgA response to probiotic bacteria and mutansstreptococci after the use of chewing gum containing *Lactobacillus reuteri*. *Pathog Dis* 2013; 68:82–87.

48. Collado MC, Grzeskowiak L, Salminen S. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol* 2007; 55: 260-65.
49. Bauer MA, Kainz K, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. *Microb Cell* 2018; 5:215-219.
50. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997; 13:258-69.
51. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997; 77:535-9.
52. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun* 1985; 47:11-4.
53. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture base materials with different surface finishes. *J Dent* 1998; 26:577-83.
54. Samaranayake LP, McCourtie J, McFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980; 25:611-5.
55. Taylor R, Maryan C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *J Prosthet Dent* 1998; 80: 592-7.
56. Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol* 1995; 22:1-14.
57. Nevzatoglu EU, O' zcan M, Kulak-Ozkan Y, Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin Oral Investig* 2007; 11:231-6.

58. Serrano-Granger R, Campo-Trapero J, Del Rí'o-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont* 2005; 18:392–8.
59. ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, et al. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res* 2009; 88:105-15.
60. Matsubara VH, Bandara HMHN, Mayer MPA, Samaranayake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clinical Practice* 2016; 62:1143.

ANEXO A

Confeção das amostras em resina acrílica ativada termicamente (RAAT)



Matriz Metálica



Conjunto lâmina de vidro e matriz metálica



A



B

(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



A



B

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



Resina acrílica ativada termicamente (RAAT)



Amostras de RAAT



Amostra de RAAT após acabamento e polimento



Padronização da espessura

ANEXO B

Avaliação da rugosidade de superfície



Leitura das amostras de RAAT, posicionadas no rugosímetro



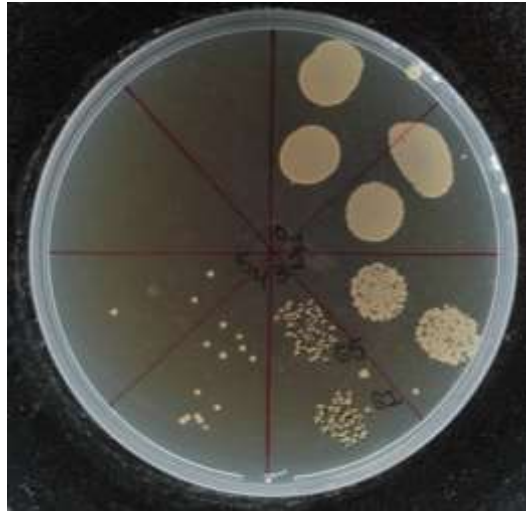
Amostras de RAAT coladas nos poços da placa de poliestireno

ANEXO C

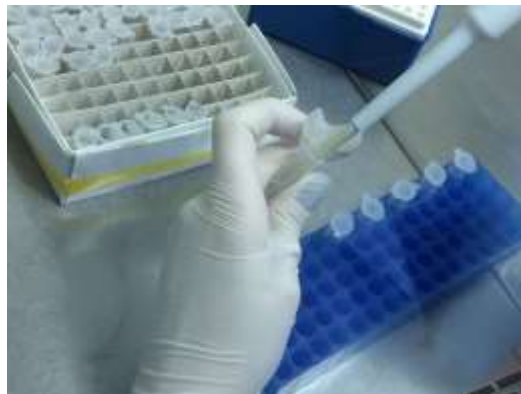
Determinação dos grupos do estudo

Probióticos comerciais utilizados



ANEXO D**Ensaio de biofilme**

Plaqueamento de *C. albicans*



Diluições decimais seriadas



Plaqueamento para contagem de UFCs



Contagem manual de UFCs



Placa após contagem de UFCs