



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**NATÁLIA INÊS GONÇALVES**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOFIBRAS DE  
POLICAPROLACTONA/NISTATINA: estudo *in vitro* e *in vivo***

2024

**NATÁLIA INÊS GONÇALVES**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOFIBRAS DE  
POLICAPROLACTONA/NISTATINA: estudo *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Prótese Dentária. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientador: Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges  
Coorientadora: Profa. Dra. Lívia Mara Alves Figueiredo Godoi

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Gonçalves, Natália Inês

Atividade antifúngica de nanofibras de policaprolactona/nistatina: estudo in vitro e in vivo / Natália Inês Gonçalves. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.

110 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientadora: Lívia Mara Alves Figueiredo Godoi

1. Estomatite sob prótese. 2. Candida albicans. 3. Eletrofiliação. 4. Nistatina. 5. Sistema de liberação de medicamentos. I. Borges, Alexandre Luiz Souto, orient. II. Godoi, Lívia Mara Alves Figueiredo, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA**

A estomatite protética, o processo inflamatório mais frequente associado a reabilitação com próteses removíveis, é causada principalmente pela infecção fúngica por *Candida albicans*. O tratamento com medicamentos antifúngicos é desafiador devido à alta taxa de recorrência e às limitações dos medicamentos tópicos. A dificuldade em alcançar concentrações terapêuticas e o sabor amargo prejudicam a adesão do paciente ao tratamento, enquanto o uso sistêmico exige cautela devido aos potenciais efeitos colaterais e ao risco do desenvolvimento de resistência. Portanto, o desenvolvimento de tratamentos alternativos, como nanofibras poliméricas sintetizadas por eletrospinação, mostra-se vantajoso. A liberação controlada do antifúngico incorporado a um biomaterial aumenta a atividade terapêutica, mantendo o contato com a mucosa infectada, reduzindo a toxicidade, os efeitos colaterais e a frequência de administração. Além disso, esse sistema alivia a responsabilidade do paciente pela administração direta, beneficiando especialmente usuários de próteses removíveis, que pode enfrentar dificuldades na autoadministração de medicamentos, como os idosos.

## **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

Prosthetic stomatitis, the most common inflammatory process associated with removable prosthesis rehabilitation, is primarily caused by fungal infection from *Candida albicans*. Treatment with antifungal medications is challenging due to the high recurrence rate and limitations of topical drugs. Difficulty in achieving therapeutic concentrations and the bitter taste hinder patient adherence to treatment, while systemic use requires caution due to potential side effects and the risk of developing resistance.

Therefore, the development of alternative treatments, such as electrospun polymer nanofibers, proves advantageous. The controlled release of the antifungal incorporated into a biomaterial enhances therapeutic activity, maintaining contact with the infected mucosa, reducing toxicity, side effects, and administration frequency. Additionally, this system alleviates the patient's responsibility for direct administration, particularly benefiting removable prosthesis users who may face challenges in self-administering medications, such as the elderly.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Tit. Juliana Campos Junqueira**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Assoc. Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes**

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de São Paulo

**Profa. Dra. Jéssica Dias Santos**

Universidade São Francisco

Campus de Bragança Paulista

São José dos Campos, 31 de janeiro de 2024.

## DEDICATÓRIA

*Em primeiro lugar, dedico este trabalho a Deus, que guiou meu caminho até esse momento.*

*Também à minha família, a qual devo minha vida, e nunca serei capaz de retribuir tudo o que fazem por mim.*

*Ao meu pai, Leduino, que eu gostaria que pudesse ter me visto recebendo esse título. Sei o quanto se sacrificou para me proporcionar uma boa educação. Obrigada por me incentivar nos estudos e mostrar a importância de uma profissão. Nunca vou esquecer sua felicidade quando passei na Unesp. Sem você eu não estaria aqui hoje.*

*À minha mãe Rosana, que é uma mulher que a cada dia se prova ser mais forte e sempre faz tudo por mim e pela minha família. Ela é minha base, um dos principais apoios que tenho na minha vida.*

*Minhas irmãs Fernanda e Marcela, que foram meus exemplos de determinação para estudar e, até hoje, nunca desistiram desse processo e a busca de conhecimento. Marcela, sem você talvez eu nem estivesse na Unesp, afinal, você me incentivou, literalmente pagou o vestibular e me levou para fazer as provas. Se eu seguisse minha teimosia, não teria descoberto a minha paixão pela Odontologia.*

Aos meus cunhados **Carlos** e **Renato**, que são pessoas tão boas para mim e minha família. Sou muito grata pela sorte que tivemos por terem entrado em nossas vidas.

Aos nossos presentinhos, meus sobrinhos **Joaquim** e **Lucas**, que trazem tanta alegria para os nossos dias.

Agradeço também às minhas amigas **Ana Beatriz**, **Barbara**, **Bruna**, **Débora**, **Fernanda** e **Rafaella**, minha segunda família desde os tempos de escola. Independente do caminho que cada uma seguiu, a presença constante e o apoio de vocês foram fundamentais para mim.

Às amigas da faculdade **Fernanda**, **Joyce** e **Vanessa**, que me acompanharam um pouquinho mais de perto. Obrigada pelos desabafos, almoços, cafés e nossos encontrinhos sempre especiais que tornaram a rotina mais leve.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor *Alexandre Borges*, faltam palavras para descrever minha gratidão. Você sempre me encantou com sua alegria, sua vontade de ensinar e foi uma das motivações que me fez fazer pós-graduação. Ser sua orientada foi uma grande aventura e oportunidade que jamais vou esquecer. Você é uma pessoa muito especial e um exemplo de profissional. Obrigada pelo imenso aprendizado, pela paciência, disponibilidade, pelo bom humor (até nas horas mais tensas) e a confiança que sempre teve em mim.

A minha coorientadora, *Livia Figueiredo Godoi*, que passou comigo inúmeras horas de biotério e laboratório, inclusive em fins de semana e feriados. Sua ajuda foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho, obrigada por tudo!

Agradeço à professora *Juliana Junqueira*, que gentilmente abriu as portas de seu laboratório, confiou em mim e me acolheu como uma de suas alunas. Neste trabalho, saí totalmente da minha zona de conforto e mergulhei em outro mundo, na pesquisa com animais e a Microbiologia. Obrigada por compartilhar sua experiência e considerações desde o desenvolvimento dessa pesquisa.

À *Maira e Paulo*, cuja contribuição foi fundamental na condução da pesquisa. Muito obrigada pela ajuda!

À professora **Luana Marotta** por todo o apoio ao longo dos experimentos no Biotério. Sei que em alguns momentos te dei trabalho, mas obrigada por sempre estar disposta a nos ajudar!

Agradeço a professora **Dayane Tada** e a **Universidade Federal Paulista (Unifesp)** pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores e colegas da pós-graduação, ao **Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – Unesp**, eterna FOSJC, que foi minha segunda casa nos últimos treze anos. Aqui cresci, vivi todos os tipos de histórias e emoções, que boas ou ruins, guardo com carinho, pois me tornaram quem sou hoje. Tenho muito orgulho de ser Unespiana.

A cada profissional que me auxiliou nessa etapa, em especial os funcionários do **Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, **Fernando Fontes**, **Juliane Damasceno**, **Lilian Vilela**, **Marco Alfredo** e **Thaís Paradella**. Também gostaria de agradecer ao **Sérgio Alves** do **Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal**. Apreendi muito com cada um de vocês.

O professor **Sérgio Lopes** foi um dos maiores exemplos de docentes que tive. Sempre proporcionou um clima leve na disciplina de Radiologia, minha segunda paixão, na qual fiz sempre questão de

*estar por perto, fazendo estágios. Seu prazer em ensinar é inspirador.*

*À minha querida amiga **Jéssica Dias Santos**, que sempre foi muito especial. Você me iniciou na carreira acadêmica, me apresentou a apaixonante linha de pesquisa dos biomateriais.*

*Você sempre foi um suporte enorme para mim, principalmente quando entrei na pós e fui apresentada a um mundo totalmente diferente do que estava acostumada da graduação. São tantos anos de aprimoramento nessa pesquisa e não imaginávamos que chegaríamos até aqui. Obrigada por todo apoio e por se disponibilizar a estar aqui nesse dia, foi uma honra te ter na minha banca.*

*À professora **Ligia Gomes**, que foi um prazer enorme te conhecer! Queria agradecer a hospitalidade e a recepção em seu laboratório. É uma alegria imensa ter você como membro da minha banca.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes)**, pela concessão de bolsa de estudo.*

*“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem”.*

*Guimarães Rosa*

## RESUMO

Gonçalves NI. Atividade antifúngica de nanofibras de policaprolactona/nistatina: estudo *in vitro* e *in vivo* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

Este estudo avaliou a eficácia *in vitro* e *in vivo* de mantas de nanofibras (NF) de policaprolactona (PCL) incorporadas com nistatina (NIS) no tratamento da estomatite protética (EP) em modelos animais. NF foram sintetizadas com diferentes concentrações de NIS, totalizando quatro soluções: PCL puro, PCL/NIS 0,045 g, PCL/NIS 0,090 g e PCL/NIS 0,225 g. A liberação da NIS foi analisada por espectroscopia Ultravioleta-Visível. A capacidade das mantas de inibir o biofilme de *Candida albicans*, principal fator etiológico da EP, dividindo-se cinco grupos (N=5) compostos por um grupo com controle de células de *C. albicans* e com PCL puro, além das três concentrações de NIS. A seguir, foi analisada a viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat) por meio do teste colorimétrico de resazurina. Cinco grupos foram divididos (N=10): controle celular, PCL puro e as três concentrações de NIS. Em modelos animais de ratos Wistar albinos (N=18), dispositivos palatinos (DP) de resina acrílica foram confeccionados simulando próteses totais e utilizados para a indução da EP. Para isso, DP contaminados com *C. albicans* foram cimentados na região molar da cavidade bucal dos animais e permaneceram em boca por 48 h. Após esse período, os DP foram removidos e os animais foram divididos em três grupos: (C) controle; (B1) com tratamento por mantas de PCL/NIS 0,045 g e (B2) PCL/NIS 0,225 g, com N=6. Então novos DP, livres de contaminação, foram cimentados na cavidade oral dos animais e permaneceu por mais 48 h. Após esse período, os animais foram eutanasiados, a contagem de UFC/ mL foi realizada e os palatos foram coletados para a análise histológica. A curva padrão de NIS obtida apresentou R<sup>2</sup> de 0,99. As três concentrações de NF apresentaram liberação de NIS, com pico no tempo de 6 h e valores de 66,26 µg/ mL para PCL/NIS 0,045 g, de 333,87 µg/ mL para PCL/NIS 0,090 g e 436,51 µg/ mL para PCL/NIS 0,225 g, constantes até o fim do experimento. Os grupos com NIS reduziram em 2,5 log<sub>10</sub> de crescimento do biofilme fúngico em relação aos grupos sem tratamento, Controle e PCL, sem diferença estatística significativa. Não foi observada citotoxicidade nas células HaCat, com viabilidade celular de 93,7% para PCL/NIS 0,045 g, 72,6% para PCL/NIS 0,090 g e 72,4% para PCL/NIS 0,225 g. A indução da EP nos três grupos foi possível e, porém, sem redução significativa na contagem de UFC/ mL de *C. albicans* nos grupos B1 e B2. Na análise histológica do grupo C pôde-se observar infiltração de hifas de *Candida* na camada queratinizada, presença de células inflamatórias formando micro abscessos e um discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio infectado. Nos grupos B1 e B2 não foram encontradas alterações epiteliais, concluindo-se que as NF demonstraram atividade antifúngica *in vitro* e foram efetivas na prevenção da penetração de hifas no tecido palatino de animais com DP.

Palavras-chave: Estomatite sob prótese; *Candida albicans*; Eletrofiação; Nistatina; Sistema de liberação de medicamentos.

## ABSTRACT

Gonçalves NI. Antifungal activity of polycaprolactone/nystatin nanofibers: *in vitro* and *in vivo* study [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

*This study evaluated the in vitro and in vivo efficacy of nanofiber (NF) mats of polycaprolactone (PCL) incorporated with nystatin (NIS) in the treatment of denture stomatitis (DS) in animal models. NFs were synthesized with different concentrations of NIS, totaling four solutions: pure PCL, PCL/NIS 0.045 g, PCL/NIS 0.090 g, and PCL/NIS 0.225 g. The release of NIS was analyzed by Ultraviolet-Visible spectroscopy. The ability of the mats to inhibit Candida albicans biofilm, the main etiological factor of DS, was assessed by dividing five groups (N=5) composed of a group with C. albicans cell control and with pure PCL, in addition to the three concentrations of NIS. Next, cell viability in human keratinocytes (HaCat) was analyzed using the resazurin colorimetric test. Five groups were divided (N=10): cell control, pure PCL, and the three concentrations of NIS. In albino Wistar rat animal models (N=18), palatal devices (PD) made of acrylic resin were fabricated to simulate total prostheses and used to induce DS. For this, PD contaminated with C. albicans were cemented in the molar region of the animals' oral cavity and remained in the mouth for 48 hours. After this period, the PDs were removed, and the animals were divided into three groups: (C) control; (B1) treated with PCL/NIS 0.045 g mats, and (B2) PCL/NIS 0.225 g, with N=6. Then new, uncontaminated PDs were cemented in the animals' oral cavity and remained for another 48 hours. After this period, the animals were euthanized, UFC/ mL counts were performed, and the palates were collected for histological analysis. The standard NIS curve obtained showed an R<sup>2</sup> of 0.99. The three concentrations of NF showed NIS release, with a peak at 6 h and values of 66.26 µg/ mL for PCL/NIS 0.045 g, 333.87 µg/ mL for PCL/NIS 0.090 g, and 436.51 µg/ mL for PCL/NIS 0.225 g, remaining constant until the end of the experiment. The groups with NIS reduced fungal biofilm growth by 2.5 log<sub>10</sub> compared to the untreated groups, Control and PCL, with no significant statistical difference. No cytotoxicity was observed in HaCat cells, with cell viability of 93.7% for PCL/NIS 0.045 g, 72.6% for PCL/NIS 0.090 g, and 72.4% for PCL/NIS 0.225 g. Induction of DS in the three groups was possible; however, there was no significant reduction in UFC/ mL counts of C. albicans in groups B1 and B2. Histological analysis of group C revealed infiltration of Candida hyphae in the keratinized layer, presence of inflammatory cells forming micro abscesses, and a discreet inflammatory infiltrate in the connective tissue underlying the infected epithelium. No epithelial alterations were found in groups B1 and B2, concluding that NFs demonstrated in vitro antifungal activity and were effective in preventing hyphal penetration into palatal tissue in animals with PD.*

**Keywords:** Denture Stomatitis; Candida albicans; Electrospinning; Nystatin; Drug delivery system.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Quatro estágios da formação do biofilme de <i>C. albicans</i> .....	29
Figura 2 – Esquema do equipamento de eletrofiação .....	37
Figura 3 – Representação das quatro regiões do jato da solução .....	38
Figura 4 – Efeito da variação da tensão na formação do cone de Taylor .....	39
Figura 5 – Micrografias de nanofibras poliméricas .....	40
Figura 6 – Ilustração esquemática de dispositivo palatino .....	44
Figura 7 – Fluxograma da metodologia do trabalho .....	47
Figura 8 – Sistema preparado para eletrofiação .....	49
Figura 9 – Disposição dos grupos na microplaca de 96 poços .....	52
Figura 10 – Microplaca de 96 poços preparada para análise da viabilidade celular em células HaCat .....	54
Figura 11 – Microplaca de 96 poços após a redução do sal de resazurina e mudança de cor .....	55
Figura 12 – Moldagem anatômica com silicone de condensação .....	56
Figura 13 – Modelo anatômico obtido .....	57
Figura 14 – Inclusão em mufla .....	58
Figura 15 – Moldeira individual finalizada .....	59

Figura 16 – Passos para obtenção para obtenção do dispositivo palatino .....	60
Figura 17 – Dispositivo palatino armazenado em tubo Falcon .....	61
Figura 18 – Microplacas de 24 poços com dispositivos palatinos imersos em suspensão padronizada de <i>C. albicans</i> .....	63
Figura 19 – Microplacas de 24 poços com dispositivos palatinos após troca de meio de cultura .....	63
Figura 20 – Sequência da cimentação dos dispositivos palatinos .....	66
Figura 21 – Curva padrão de liberação da nistatina .....	69
Figura 22 – Liberação de nistatina pelas amostras de PCL/NIS analisadas .....	70
Figura 23 – Contagem de UFC/ mL de <i>C. albicans</i> em biofilmes não tratados e tratados.....	71
Figura 24 – Análise da viabilidade celular em queratinócitos humanos .....	72
Figura 25 – Tubos contendo dispositivos palatinos em meio de cultura .....	73
Figura 26 – Análise da esterilidade dos dispositivos em espectrofotômetro .....	73
Figura 27 – Médias e desvio padrão da análise de absorvância dos caldos com a presença do corante TCC.....	74
Figura 28 – Médias e desvio padrão da contagem de UFC/ mL de <i>C. albicans</i> das amostras recuperadas do palato dos ratos dos DPs dos grupos C e B1 .....	75
Figura 29 – Médias e desvio padrão da contagem de UFC/ mL de <i>C. albicans</i> das amostras recuperadas do palato dos ratos do grupo C e B2 .....	76

Figura 30 – Lâminas histológicas do grupo C demonstrando infiltração de hifas na camada queratinizada .....	77
Figura 31 – Lâminas histológicas do grupo C demonstrando micro abscessos .....	78
Figura 32 – Lâminas histológicas do grupo C demonstrando a presença de discreto infiltrado inflamatório .....	78
Figura 33 – Lâminas histológicas sem alterações epiteliais .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusion Brain Heart
CMM	Concentração microbica mínima
DMF	Dimetilformamida
DP	Dispositivo palatino
EP	Estomatite protética
CIM	Concentração inibitória mínima
MEC	Matriz extracelular
NF	Nanofibras
NIS	Nistatina
PBS	Solução salina tampão fosfato
PCL	Policaprolactona
PCL/NIS	Nanofibras de policaprolactona com adição de nistatina
PMMA	Polimetilmetacrilato
PT	Prótese total
RAAT	Resina acrílica ativada termicamente
UFC	Unidade formadora de colônias
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visível
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
YNB	Yeast Nitrogen Base

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Candidíase oral.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.1 Estomatite protética .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2 Etiologia e patogênese.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 C. albicans e biofilme .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Terapêutica .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Biomateriais e <i>drug delivery</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 Processo de eletrofiação .....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Estudo em modelos animais .....</b>	<b>42</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>46</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Síntese das nanofibras .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.1 Proporcionamento das soluções .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.2 Técnica da eletrofiação .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.1 Curva padrão da nistatina.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.2 Cinética de liberação da nistatina.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Padronização da suspensão de <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4 Análise das nanofibras em biofilme de <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5 Análise da viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat) .....</b>	<b>53</b>
<b>4.6 Análise <i>in vivo</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>4.6.1 Modelos animais.....</b>	<b>55</b>
<b>4.6.2 Confeção dos dispositivos palatinos de resina acrílicas .....</b>	<b>56</b>
<b>4.6.3 Análise da esterilidade dos dispositivos palatinos .....</b>	<b>60</b>
<b>4.6.4 Administração de tetraciclina.....</b>	<b>61</b>
<b>4.6.5 Modificações na dieta alimentar .....</b>	<b>62</b>
<b>4.6.6 Formação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> nos dispositivos palatinos... ..</b>	<b>62</b>

4.6.7 Verificação da colonização natural por <i>Candida spp.</i> na cavidade bucal dos animais.....	64
4.6.8 Inoculação da suspensão de <i>C. albicans</i> na cavidade bucal dos animais .....	64
4.6.9 Divisão dos tratamentos .....	64
4.6.10 Cimentação dos dispositivos palatinos .....	65
4.6.11 Recuperação de <i>C. albicans</i> da cavidade bucal dos animais.....	67
4.6.12 Eutanásia dos animais .....	67
4.6.13 Análise histológica .....	67
4.7 Análise estatística .....	68
5 RESULTADO .....	69
5.1 Espectroscopia UV-Vis .....	69
5.1.1 Curva padrão da nistatina.....	69
5.1.2 Cinética da liberação da nistatina.....	69
5.2 Análise das nanofibras em biofilme de <i>C. albicans</i> .....	71
5.3 Análise da viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat) .....	71
5.4 Análise da esterilidade dos dispositivos palatinos .....	72
5.5 Contagem de UFC/ mL .....	74
5.6 Análise histológica .....	76
6 DISCUSSÃO .....	80
7 CONCLUSÃO .....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO.....	110

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar das melhorias na preservação dos dentes naturais e consequente redução da perda dentária, com o envelhecimento global da população, o edentulismo permanece um desafio (Borg-Bartolo et al., 2022; Loster et al., 2016). De acordo com o Painel de Indicadores de Saúde da Pesquisa Nacional de Saúde de 2019, cerca de 31,7% das pessoas com 60 anos ou mais e aproximadamente 50% daqueles com mais de 75 anos perderam todos os dentes (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2019). Já a Organização Mundial da Saúde estimou que até 2022, em torno de 22,7% da população idosa global sofreu a perda completa dos dentes (United Nations, 2020).

Nesses casos, a reabilitação protética, muitas vezes envolvendo próteses dentárias removíveis, é necessária para a melhora da qualidade de vida (Emami et al., 2013). Mesmo reabilitados, o acompanhamento contínuo dos pacientes é indispensável, uma vez que enfrentam um risco considerável de desenvolver a estomatite protética (EP), processo inflamatório mais comum associado a próteses totais (PT) ou parciais removíveis, afetando cerca de 70% desses pacientes. Visitas regulares são essenciais para avaliar o ajuste e a função adequada das próteses, bem como a manutenção da higiene oral, visando prevenir o desenvolvimento da EP (Desai, Nair, 2023; Gendreau, Loewy, 2011; Mandali et al., 2011).

A EP se caracteriza por variados graus de eritema, às vezes acompanhados por hemorragia petequeal e edema, em partes ou em toda a mucosa sob próteses dentárias, especialmente na região palatina (de Souza et al., 2017; Hilgert et al., 2016; Neville et al., 2016; Zuluaga et al., 2011). Sua etiologia é considerada multifatorial, e resulta da combinação de fatores locais, como: má higiene oral, uso contínuo das próteses, próteses mal ajustadas, idade das próteses, tabagismo e xerostomia. Além de fatores sistêmicos, como a idade avançada, desnutrição, imunossupressão e a utilização de antibióticos de amplo espectro (Fang et al., 2021; Lavaee et al., 2018; Queen et al., 2021; R, Rafiq, 2023). Estes fatores tornam tanto a mucosa oral quanto a base da prótese susceptíveis a colonização fúngica por *Candida spp.* principalmente *C. albicans* (Martori et al., 2014; Zomorodian et al., 2011).

O tratamento da EP é desafiador e envolve práticas essenciais de higiene oral

e cuidados com as próteses. Em alguns casos, pode ser necessário realizar ajustes ou confeccionar uma nova prótese. Adicionalmente, a terapia antifúngica pode ser recomendada para avaliar os sinais e sintomas clínicos (Chopde et al., 2012; Grover et al., 2022; Queen et al., 2021). A escolha do tratamento, ou a combinação de diferentes abordagens, deve ser individualizada para cada paciente. O sucesso do tratamento depende dos métodos que reduzem a presença dos microrganismos na mucosa infectada e nas superfícies internas da prótese. Neste caso, é importante ressaltar que medicamentos antifúngicos podem não atingir concentrações terapêuticas adequadas nas próteses, e o acúmulo de biofilme pode transformá-la em um reservatório para possíveis infecções futuras (Bueno et al., 2017; da Costa et al., 2020; Neppelenbroek, 2016).

A terapêutica indicada inclui o uso de antifúngicos tópicos ou sistêmicos, como nistatina (NIS), fluconazol, miconazol, cetoconazol e itraconazol (Choi et al., 2010; Emami et al., 2014; Lyu et al., 2016; Mishra et al., 2007; Rai et al., 2022; Scalercio et al., 2007). A NIS, considerada tratamento padrão, está associada à baixa adesão do paciente devido ao sabor desagradável, que pode causar náusea, além da alta frequência de dosagem. Outro desafio consiste em manter uma concentração efetiva do medicamento nos tecidos infectados devido a diluição pelo fluxo salivar, movimentos da língua e deglutição (Altinci et al., 2018; Neppelenbroek, 2016; Neville et al., 2016; Rai et al., 2022). Quando a abordagem sistêmica se torna necessária, os medicamentos devem ser administrados com cautela, pois, além de efeitos colaterais, seu uso generalizado pode promover a seleção de espécies resistentes e o desenvolvimento de mutações em leveduras (Sanitá et al., 2012; Zhai et al., 2020).

Buscando superar estes obstáculos, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos, ou *drug delivery*, reduz a frequência de administração e melhora a eficácia de fármacos em locais específicos, minimizando potenciais efeitos colaterais (Bhatt et al., 2021; Borandeh et al., 2021). Esses sistemas também eliminam a necessidade de adesão rigorosa por parte do paciente, o que é especialmente vantajoso para idosos ou pessoas com capacidade motora e função cognitiva limitadas (Chow et al., 1999; Lamb, Douglas, 1988).

Uma abordagem promissora para a entrega de medicamentos é o uso de nanofibras (NF) produzidas por eletrofiação, um método simples e de grande aplicabilidade. Essa técnica possibilita a síntese de fibras com diâmetros que variam

de escala submicrométrica à nanométrica, capaz de criar blendas poliméricas com compostos orgânicos e inorgânicos, que pode atender desde a área de materiais, ciência e tecnologia à medicina clínica (Bhardwaj, Kundu, 2010; Chaparro et al., 2019; Chen et al., 2010; Reneker, Yarin, 2008; Wang, Windbergs, 2019).

O sistema de eletrofiação geralmente consiste em três componentes principais: uma fonte de alta tensão, uma seringa com agulha de diâmetro pequeno e um anteparo coletor (uma placa ou mandril rotativo). Neste processo, quando a diferença de potencial supera a tensão superficial do polímero, um jato líquido é ejetado, alongado e acelerado pelo campo elétrico. Neste momento, o solvente presente na solução polimérica é evaporado gradualmente, resultando em uma manta não tecida de fibras, que, por fim, é depositada sob um substrato. Este método permite ainda modificar as propriedades biológicas e físicas dos materiais (Huang et al., 2003; Liang et al., 2007).

Inúmeros polímeros, sintéticos e naturais, podem ser eletrofiados, dentre eles, a policaprolactona (PCL), um poliéster alifático biodegradável, biocompatível, hidrofóbico, semicristalino e que possui lenta degradação (aproximadamente dois e três anos) (Chandra, Rustgi, 1998; Coombes et al., 2004; Duan et al., 2007; Hivenchi et al., 2018; Karuppuswamy, 2015; Liu et al., 2019; Sisson et al., 2013; Teoh et al., 2019; Ulery et al., 2011). Segundo a literatura, este é o polímero mais comumente utilizado para a técnica da eletrofiação (Cipitria et al., 2011; Woodruff, Huttmacher, 2010). Outra característica deste material, é possuir uma alta permeabilidade a muitos medicamentos (Corden et al., 1999; Duan et al., 2007; Monteiro et al., 2017; Woodruff, Huttmacher, 2010).

A evolução de dispositivos nanométricos fabricados a partir de polímeros tem aberto novos caminhos para a encapsulação de agentes antimicrobianos, criando sistemas de entrega de medicamentos aprimorados. Medicamentos liberados localmente em uma taxa limitada podem prolongar o tempo de residência tecidual, resultando em concentrações mais elevadas e um aumento no efeito terapêutico, em comparação com outras vias de administração. Essa abordagem tem o potencial de melhorar a biodisponibilidade dos antimicrobianos e ampliar sua atividade biológica (Frandsen, Ghandehari, 2012; Wani et al., 2014).

Em estudo prévio conduzido pelo grupo de pesquisa, Santos (2020) desenvolveu uma manta de NF eletrofiadas utilizando o polímero PCL, com a adição

do antifúngico NIS. Esse trabalho, envolveu testes de caracterização morfológica para otimização dos parâmetros, resultando em NF sem defeitos e com menor diâmetro. Análises físico-químicas confirmaram as características dos materiais e as mantas demonstraram propriedades fungicidas e fungistáticas através de testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) realizada em células planctônicas de *C. albicans*.

Embora esse biomaterial tenha mostrado potencial como sistema de liberação de medicamento, é essencial realizar avaliações *in vitro* de seu efeito em biofilmes, que ao contrário das células planctônicas, representam comunidades microbianas estruturadas (Douglas, 2003). A avaliação da segurança das mantas *in vitro*, além de seu uso como tratamento da EP induzida em modelos *in vivo* também é necessária.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Candidíase oral**

A candidíase da mucosa oral pode apresentar diferentes padrões clínicos, como pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica crônica e muco cutânea. Muitos pacientes exibem um padrão único, embora alguns indivíduos exibam mais de uma forma clínica de candidíase oral (Dangi et al., 2010; Neville et al., 2016). A forma de candidíase eritematosa, é o tipo mais comum e muitas vezes é clinicamente negligenciada. Pode apresentar diversas formas, incluindo a candidíase atrófica aguda, atrofia papilar central da língua (glossite rombóide mediana), candidíase multifocal crônica e, quando envolve a comissura bucal, resulta em queilite angular. Muitas vezes a candidíase associada a próteses ou EP é classificada como uma forma de candidíase eritematosa (Hu et al., 2019; Neville et al., 2016).

#### **2.1.1 Estomatite protética**

Descrita por Cahn (1936) como “boca dolorida por prótese”, a EP é geralmente assintomática, embora alguns pacientes possam relatar coceira, queimação, dor na região em contato com as próteses, boca seca, alterações no paladar e dificuldade para engolir. Lesões associadas, como queilite angular e glossite romboide mediana também podem ocorrer (Budtz-Jorgensen, Bertram, 1970; Gendreau, Loewy, 2011; Neville et al., 2016).

Newton (1962) categorizou os estágios dos clínicos como: (I) Hiperemia puntiforme, com múltiplos pontos hiperêmicos nos ductos das glândulas salivares palatinas menores; (II) Hiperemia difusa, caracterizada por inflamação generalizada na mucosa recoberta pela prótese, que se apresenta lisa e atrófica; e (III) Hiperemia granular, com mucosa hiperêmica e aparência nodular, frequentemente restrita à região central do palato, recoberta pela prótese. A EP pode progredir do estágio I para

o II, e posteriormente para o III, caso não seja tratada. Newton propôs que o grau de inflamação está relacionado ao envolvimento dos ductos salivares, pois os tecidos periductais são menos resistentes aos processos inflamatórios. Butz-Jorgensen e Bertram (1970) observam que essa teoria não aborda o eritema difuso, mas sim uma inflamação da membrana mucosa restrita à parte posterior do palato duro.

Outras classificações foram propostas, como a de Schwartz et al. (1988) subdividiram os tipos I, II e III de Newton com base na gravidade da inflamação, utilizando uma pontuação de zero a seis. Barbeau et al. (2003) ampliaram a classificação de Newton, adicionando duas subclasses baseadas na extensão das lesões: (A) processo inflamatório local sem colonização ou infecção microbiana, indicado por níveis mais baixos de presença de leveduras, cobertura de biofilme e contagem de colônias na prótese; (B) inflamação mais extensa que leva à colonização de leveduras associado a níveis mais elevados de presença de leveduras, número de colônias e cobertura de biofilme na prótese.

Recentemente, Neppelenbroek et al. (2022) propuseram uma classificação de Newton modificada, baseada em três características clínicas: (a) aparência, (b) grau de inflamação da mucosa palatina que suporta a prótese por quadrante e (c) grau de eritema (vermelhidão leve ou intensa). A combinação das pontuações desses critérios resulta na classificação da gravidade da EP.

### **2.1.2 Etiologia e patogênese**

A EP é uma condição multifatorial, cuja etiologia resulta da interação complexa entre fatores locais e sistêmicos (Černáková, Rodrigues, 2020; de Azevedo Izidoro et al., 2012; Hu et al., 2019; Oksala, 1990). O fator local primário para o desenvolvimento da doença é a presença da prótese, que exerce influência direta na redução do fluxo salivar e no suprimento de oxigênio no nível epitelial. Essa condição cria um ambiente ácido propício para a formação do biofilme de *C. albicans*. Além disso, as características da superfície do material da base protética, o polimetilmetacrilato (PMMA), como rugosidade, dureza de superfície, hidrofobicidade e porosidade, contribuem para a adesão e proliferação de *C. albicans* (Anusavice et

al., 2013; Anuta et al., 2022; Černáková, Rodrigues, 2020; Gad, Fouda, 2020; Gendreau, Loewy, 2011).

Quando a higienização bucal e da prótese não é adequada, um biofilme composto por bactérias e leveduras se forma na superfície da prótese, transformando-a em um reservatório de microrganismos. Essa situação expõe a mucosa a uma presença constante de toxinas e resíduos metabólicos, resultado em lesões celulares e inflamação crônica persistente, que o organismo hospedeiro não consegue eliminar (de Souza et al., 2017; Gad, Fouda, 2020; Gendreau, Loewy, 2011; Johnson et al., 2012; O'Donnell et al., 2017; Rodríguez Acosta et al., 2014).

O uso noturno de próteses acentua essa condição ao diminuir o efeito protetor da saliva, restringir a limpeza adequada da língua e comprometer a oxigenação da mucosa palatina. Portanto, é consenso na literatura que os usuários de próteses devem removê-las durante a noite (Černáková, Rodrigues, 2020; Emami et al., 2014; Lambson, Anderson, 1967). Além disso, a idade da prótese e as condições de armazenamento são consideradas fatores contribuintes (Ercalik- Yalcinkaya, Ozcan, 2015), O PMMA sofre deterioração em termos de dureza e conteúdo volátil ao longo do uso prolongado na cavidade oral. De acordo com Matsuo et al. (2015), essa deterioração é observada principalmente na camada superficial da prótese devido à exposição a enzimas salivares, enzimas e/ou metabólitos microbianos.

A xerostomia, ou sensação de boca seca, está associada a um aumento na prevalência da EP e pode impactar o uso de prótese (Jensen, Vissink, 2014). A saliva desempenha um papel duplo na adesão de *C. albicans* ao PMMA, exercendo também um efeito de limpeza física por meio de componentes antimicrobianos, como lisozimas, imunoglobulinas, glicoproteínas, lactoferrina e peroxidase (Anuta et al., 2022; Salerno et al., 2011). Esses constituintes interagem com as espécies de *Candida*, reduzindo sua adesão e colonização nas superfícies da mucosa oral. No entanto, algumas proteínas salivares, como mucinas e estaterinas, podem atuar como receptores para as nano proteínas presentes nas paredes celulares de *C. albicans*, promovendo sua adesão (Dodds et al., 2005). A redução do fluxo salivar sob a superfície de adaptação da prótese promove ainda mais a adesão de *C. albicans* à sua base e às superfícies mucosas adjacentes, devido à diminuição da limpeza e da atividade antimicrobiana normalmente promovida pela saliva.

A incidência da xerostomia aumenta com a idade, afetando aproximadamente

30% das pessoas com mais de 65 anos. Esse fato pode ser parcialmente atribuído à tendência de os idosos utilizarem medicamentos com efeito xerogênico para tratar condições crônicas, incluindo antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos de recaptação de serotonina, antipsicóticos, anti-hipertensivos, betabloqueadores, broncodilatadores, antimuscarínicos, relaxantes musculares de ação central, antagonistas dos receptores H<sub>2</sub>, inibidores da bomba de prótons, quimioterápicos, opióides e benzodiazepínicos e anticolinérgicos. Esses medicamentos podem resultar em uma redução geral da taxa de fluxo salivar não estimulado. Além disso, os idosos são mais propensos a desenvolver comorbidades relacionadas ao envelhecimento, como a doença de Parkinson, Alzheimer e diabetes, que apresentam xerostomia como sintoma (An et al., 2018; Černáková, Rodrigues, 2020; Einhorn et al., 2020; Macedo et al., 2014; Rodríguez Acosta et al., 2014; Villa et al., 2014; Yousefi, Abdollahi, 2018). A perda da função das glândulas salivares também pode ser observada em pacientes com Síndrome de Sjögren ou submetidos à radioterapia (Dodds et al., 2005).

Cawson (1965) demonstrou que traumas na mucosa causados por próteses mal ajustadas, com superfícies ásperas ou rachadas também são fatores etiológicos. Brantes et al. (2019), mostraram que a presença de ulceração traumática estava associada à presença de fraturas na base das próteses e a reparos prévios de próteses quebradas. Essa reação inflamatória resultante do trauma cria um ambiente favorável para a invasão de *C. albicans*.

Traumas podem ser causados por má adaptação devido ao desconforto causados por cristas alveolares residuais reabsorvidas, pontiagudas ou finas. Para evitar isso, o uso de materiais reembasadores macios é feito em função de sua característica de atuar como amortecedor do impacto, aliviando o incômodo (Lee, Saponaro, 2019). Gautam et al. (2012) relata que foram identificadas culturas fúngicas em 85% dos pacientes com próteses revestidas por reembasadores macios permanentes.

Segundo revisão de Dorocka-Bobkowska et al. (2017), esses materiais fornecem soluções de curto prazo para os problemas do paciente e em caso de uso prolongado, tornam-se irritantes para a mucosa, pois se tornam difíceis de higienizar e são propensos à deterioração, o que aumenta sua aspereza, o acúmulo de biofilme e os sintomas de EP. Estas informações corroboram com outros achados na literatura (Abuhajar et al., 2023; Garcia, Jones, 2004; Valentini et al., 2013).

Outro grande fator local associado é o tabagismo. O mecanismo exato pelo qual esse hábito induz a EP permanece incerto; no entanto, uma hipótese sugere que ele pode causar alterações epiteliais localizadas, como espessamento da camada epitelial queratinizada, o que pode contribuir para a colonização fúngica. Além disso, os constituintes do tabaco afetam não só as células epiteliais, mas também interferem na atividade antimicrobiana exercida pela saliva. Outra proposição é que os hidrocarbonetos aromáticos presentes na fumaça do cigarro servem como nutriente para o crescimento e proliferação de fungos. Adicionalmente, o consumo crônico de cigarros de tabaco está relacionado a casos graves de candidíase, incluindo glossite rombóide mediana (Anuta et al., 2022; de Azevedo Izidoro et al., 2012; dos Santos et al., 2010; Gunasegar et al., 2019).

Entre os fatores sistêmicos está a idade avançada, já que à medida que uma pessoa envelhece, a taxa de *C. albicans* presente na microbiota bucal aumenta, além da maior propensão de idosos utilizarem próteses. Cerca de 30% a 50% das pessoas são portadoras e essa taxa aumenta com a idade de pacientes dentados acima de 60 anos (Abuhajar et al., 2023; Alzayer et al., 2018; Černáková, Rodrigues, 2020; Labban et al., 2021; Neville et al., 2016; Patil et al., 2015; Singh et al., 2014).

A resposta deficiente dos elementos de defesa imunológica do hospedeiro propicia a disseminação de fatores de virulência específicos para o crescimento de *C. albicans*. De acordo com a literatura, diversos fatores podem comprometer a imunidade, incluindo diabetes, senilidade, leucemia, linfoma, câncer, radioterapia para a região da cabeça e pescoço, pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI), distúrbios hormonais e endócrinos, pessoas que receberam transplante de órgãos e portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Abuhajar et al., 2023; Alzayer et al., 2018; Campoy, Adrio, 2017; Černáková, Rodrigues, 2020; Grover et al., 2022; Hellstein 2019; Jorge, 2006, Patil et al., 2015; Pathmashri, Abirami, 2016; R, Rafiq, 2023; Távora et al., 2019). O uso prolongado de medicamentos como corticosteroides e antidepressivos, juntamente com a ampla aplicação de agentes imunossupressores e antibióticos nos últimos anos, tornou-se um fator de risco, resultando na diminuição da imunidade geral dos seres humanos, tornando a microbiota disfuncional e elevando a incidência de infecções fúngicas (Fang et al., 2021).

Uma dieta desequilibrada também pode impactar negativamente a imunidade. Alimentos como açúcares refinados, sacarose, suco de frutas, mel e xarope, exercem

uma influência significativa, atuando como estimuladores do crescimento de *C. albicans*. Além disso, a deficiência de nutrientes como vitamina A, B6, B9 e B12, ferro, níveis reduzidos de ácidos graxos essenciais, magnésio, selênio ou zinco pode comprometer a resposta imunológica. O metabolismo do ferro, por exemplo, é um elemento essencial para a diferenciação celular, transporte de oxigênio e atividade normal das células imunes (Grover et al., 2022; Martins et al., 2014; Martori et al., 2014; R, Rafiq, 2023; Zegarelli et al., 1961).

Por fim, é relevante destacar que indivíduos de baixa condição socioeconômica têm probabilidade maior de desenvolver EP devido ao acesso limitado a informações e cuidados médicos e odontológicos de rotina. Esse problema recebe notoriedade especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a desigualdade social é expressiva e muitos idosos necessitam utilizar próteses removíveis (de Souza et al., 2023; Freitas et al., 2008). A compreensão da etiologia complexa da estomatite protética, que envolve não apenas fatores relacionados à saúde, mas também socioeconômicos, é essencial para a seleção de um tratamento adequado para cada paciente.

## **2.2 *C. albicans* e biofilme**

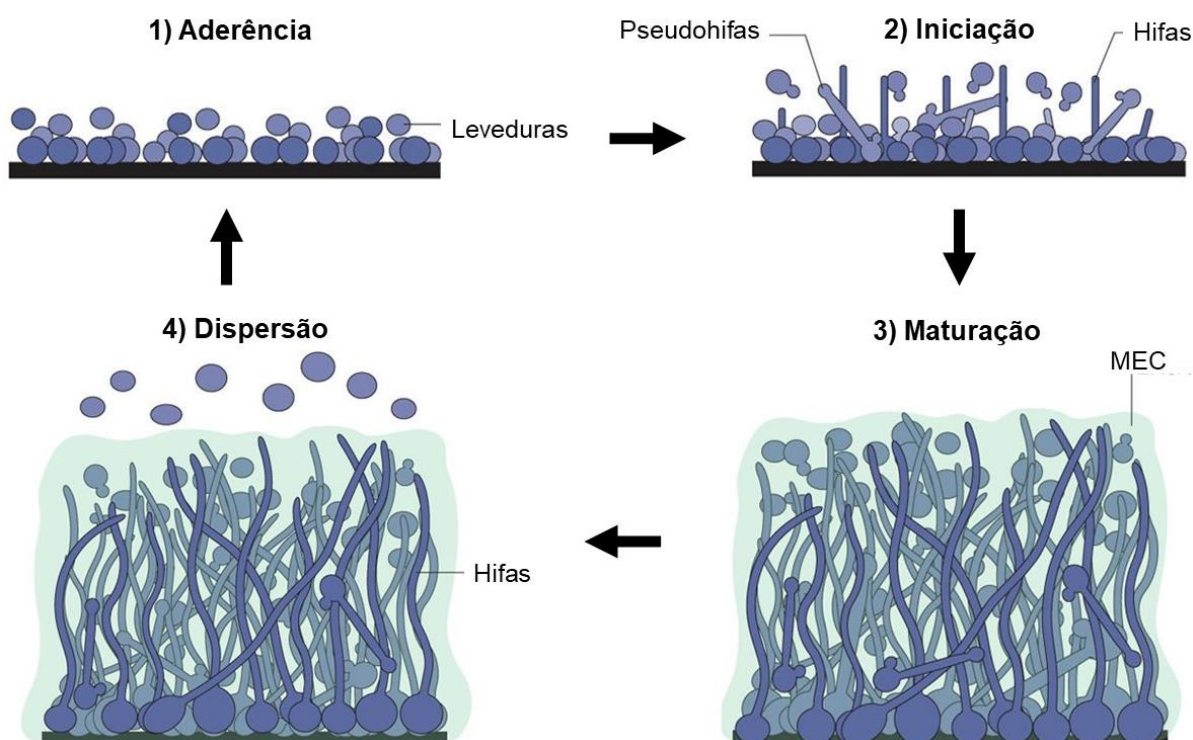
A cavidade bucal é um ambiente dinâmico, caracterizado por um pH próximo a neutralidade, temperatura constante (34 a 36 °C) e fluxo salivar contínuo, onde uma variedade de microrganismos coexiste, incluindo o reino *fungi* (Cannon, 2022; Marcotte, Lavoie 1998; Rodríguez Acosta et al., 2015). *Candida spp.* foi identificada como um possível agente causador da EP por Cahn (1936) e está presente em 35 a 60% dos indivíduos saudáveis. A espécie *C. albicans*, corresponde a 60 a 70% dos fungos isolados na EP e é considerada um de seus fatores etiológicos primordiais (Jorge, 2006; R, Rafiq, 2023).

*C. albicans* é um fungo comensal, eucariótico e dimórfico, capaz de adotar formas de levedura ou hifa. Embora seja um integrante da microbiota saudável e possa colonizar diversas superfícies do corpo humano, em circunstâncias favoráveis, a natureza dimórfica da *C. albicans* permite que o organismo transite de um estado

comensal para um estado patogênico, em grande parte por meio da formação de biofilmes. Esses biofilmes são uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície, formando estruturas tridimensionais, que conferem resistência a concentrações elevadas de medicamentos antifúngicos. Infecções oportunistas podem iniciar-se de maneira superficial e evoluir para formas sistêmicas, invadindo outros órgãos e alcançando corrente sanguínea. Esse processo pode culminar em sepse, representando um risco à vida (Alves et al., 2020; Arastehfar et al., 2020; Gheorghe et al., 2021; Hellstein, Marek, 2019; Jorge, 2006; Kumamoto, Vences, 2005; R, Rafiq, 2023; Rodríguez Acosta et al., 2014).

O desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* envolve quatro estágios: aderência, iniciação, maturação e dispersão. Inicialmente, as células de leveduras se aderem a uma superfície sólida, formando uma camada basal que ancora o biofilme. As células fúngicas tem a capacidade de se aderirem tanto a superfícies bióticas quanto abióticas, rígidas ou macias, ou até mesmo se aderir a outras células de *C. albicans*, o que é fundamental para a integridade do biofilme (Finkel, Mitchell, 2011; Gulati, Nobile, 2016; Lohse et al., 2018). A proliferação subsequente inclui a filamentação, gerando uma rede de pseudohifas e hifas que contribuem para a resistência do biofilme. Em cerca de 24 h, o biofilme maduro é caracterizado por uma mistura estruturada de células na forma de levedura, pseudohifas e hifas, envoltas por uma matriz extracelular (MEC), que atua como uma barreira física protetora do ambiente, proporcionando integridade estrutural. A MEC é composta por proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (de Barros et al., 2020; Gulati, Nobile, 2016; Lohse et al., 2018; Ponde et al., 2021; Zarnowski et al., 2014). A última fase envolve a dispersão de células de levedura e/ou pedaços do biofilme, permitindo a circulação e o estabelecimento em novos locais, facilitando a infecção sistêmica (de Barros et al., 2020; Gulati, Nobile 2016; Lohse et al., 2018; Ponde et al., 2021) (Figura 1).

Figura 1 – Quatro estágios da formação do biofilme de *C. albicans*



Legenda: 1) aderência de células de levedura a uma superfície; 2) início da formação do biofilme; 3) maturação em um biofilme complexo; 4) dispersão de levedura do biofilme.

Fonte: Adaptado de Lohse et al., 2018.

Ainda que muitos microrganismos possam formar biofilmes de espécies únicas, é mais comum encontrar biofilmes com duas ou mais espécies bacterianas e/ou fúngicas (Lohse et al., 2018). Nesse contexto, o biofilme protético é um sistema complexo que inclui outras espécies fúngicas como *Nakaseomyces glabratus* (previamente classificada como *Candida glabrata*), *Pichia kudriavzevii* (previamente classificada como *Candida krusei*), *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis*, embora em menor prevalência. Além de bacilos e cocos, especialmente espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*, que representam as formas mais comuns de bactérias encontradas (Altinci et al., 2018, Baena-Monroy et al., 2005; Chopde et al., 2012; de Azevedo Izidoro et al., 2012; Kidd et al., 2023; Neville et al., 2016; Pereira et al., 2013; Rossoni et al., 2019; Sato et al., 1997). Apesar de *C. albicans* desempenhar um papel patológico central, é crucial entender que a EP não é um fenômeno isolado. Pelo

contrário, é o resultado da interação entre diversos fatores relacionados ao hospedeiro que também necessitam ser analisados.

### 2.3 Terapêutica

O desafio no tratamento eficaz da EP levou à exploração de diversas abordagens terapêuticas para enfrentar essa condição recorrente. Entre as opções disponíveis, destacam-se três classes de antifúngicos: polienos, azóis e equinocandinas (Neville et al., 2016).

Os antifúngicos polienos, como a NIS e a anfotericina B, possuem amplo espectro de ação, atuando como agentes fungicidas. Esses medicamentos têm como alvo o ergosterol presente na membrana fúngica. Ao penetrar nas bicamadas lipídicas, eles criam poros que comprometem a integridade da membrana, resultando no vazamento de conteúdo celular e na subsequente morte celular (Campoy, Adrio, 2017; Fang et al., 2021; Ortiz, Sansinenea, 2019; Pereira et al., 2021). A NIS, isolada do microrganismo *Streptomyces noursei* por Hazen e Brown (1951), encontra-se disponível em diversas formulações como cremes tópicos, pastilhas orais e suspensões orais. Amplamente empregada na terapia tópica para infecções fúngicas orais, a NIS se destaca devido ao seu amplo espectro, baixa incidência de resistência fúngica, custo acessível e baixos efeitos colaterais (Boros-Majewska et al., 2014; Geerts et al., 2008; Ortiz, Sansinenea, 2019; Rai et al., 2022; Shukla et al., 2016).

Frequentemente descrita por pacientes como tendo um sabor amargo, a NIS pode enfrentar desafios de adesão ao tratamento. Para contornar essa questão, é comum mascarar o sabor com sacarose e agentes aromatizantes. Em casos de EP associada à xerostomia, é importante observar que o teor de sacarose na preparação de NIS pode contribuir para o desenvolvimento de cáries. É um medicamento praticamente insolúvel em água e pouco absorvido pelo trato gastrointestinal, e a sua eficácia depende do contato direto com as espécies de *Candida*. Isso implica na necessidade de múltiplas doses diárias para assegurar uma exposição adequada às leveduras responsáveis pela infecção (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2019; Contaldo et al., 2023; Neville et al., 2016; Rai et al., 2022;

Samaranayake, Samaranayake, 2001; Shukla et al., 2016).

A anfotericina B é uma alternativa terapêutica indicada para administração intravenosa no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas que apresentam risco de vida. Seu uso é significativamente restrito devido aos efeitos colaterais associados, como danos aos túbulos renais e tromboflebite (Samaranayake, Samaranayake, 2001; Shukla et al., 2016; Zotchev, 2003).

A classe dos antifúngicos azólicos, é predominantemente fungistática e agem inibindo uma enzima envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol, levando à depleção de ergosterol, essencial para a membrana celular fúngica (Campoy et al., 2017; Nivoix et al., 2020). Essa classe de antifúngicos pode ser subdividida em duas subclasses principais: os imidazóis e triazóis.

O cetoconazol, um imidazol sintetizado pela primeira vez na década de 1970, foi pioneiro como antifúngico absorvido pelo trato gastrointestinal, possibilitando tratamento sistêmico via administração oral. Sua conveniência se dá pela dose única diária, embora também apresente desvantagens. Pacientes devem evitar antiácidos ou inibidores de H<sub>2</sub>, pois a absorção eficaz requer um ambiente ácido. Exames da função hepática são recomendados para prescrições superiores a duas semanas devido à toxicidade hepática. Nos, Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) desaconselhou seu uso como primeira opção no tratamento da EP. Além disso, interações com antibióticos macrolídeos, como a eritromicina, ou anti-histamínicos potencialmente causando arritmias cardíacas graves podem ocorrer (Neville et al., 2016; Scalercio et al., 2007).

Exemplos da subclasse dos imidazóis, o clotrimazol e o miconazol, não são bem absorvidos e requerem várias administrações ao longo do dia. Possui formulação tópicas, com pomadas e pastilhas com sabor agradável e poucos efeitos colaterais. A pomada de clotrimazol também é um tratamento eficaz para a queilite angular, devido as suas propriedades antibacterianas e antifúngicas (Neville et al., 2016).

A subclasse dos triazóis, é uma das mais recentemente desenvolvidas e são comumente administrados de forma sistêmica em pacientes imunocomprometidos para prevenir e tratar infecções fúngicas (Lass-Flörl, 2011; Nivoix et al., 2020). O fluconazol é o exemplo principal, considerado mais eficaz que o cetoconazol, sua absorção sistêmica é bem realizada sem depender de um ambiente ácido ou da presença de alimentos no estômago para ser absorvido. Ele pode ser administrado

por via oral ou intravenosa (Allen et al., 2015; Nivoix et al., 2020). A longa meia-vida do fluconazol permite uma dosagem diária, com rara toxicidade hepática nas doses utilizadas no tratamento da EP. No entanto, seu uso prolongado para a prevenção pode resultar em resistência ao medicamento (Sanitá et al., 2012). Em suas interações medicamentosas, pode potencializar os efeitos da fenitoína, além de possíveis interações com compostos de varfarina e sulfonilureias (Neville et al., 2016; Scalercio et al., 2007).

Tanto o fluconazol quanto o cetoconazol devem ser administrados com cautela devido aos possíveis efeitos colaterais hepatotóxicos e nefrotóxicos. Além disso, o uso generalizado desses medicamentos tem contribuído para a seleção de espécies resistentes por meio do desenvolvimento de mutações em leveduras, resultando em um aumento da resistência aos triazóis (Chow et al., 1999; Monteiro et al., 2017, Sanitá et al., 2012).

O itraconazol é utilizado para o tratamento de candidíase orofaríngea e esofágica. Semelhante ao cetoconazol, a absorção confiável de suas formulações orais é significativamente influenciada pela presença ou ausência de alimentos e pelo pH gástrico. As cápsulas de itraconazol foram a primeira formulação oral disponível para uso e, embora sua absorção ideal ocorra na presença de alimentos e ácido gástrico, a solução oral, atualmente preferida, é melhor absorvida com o estômago vazio. É um fármaco contraindicado para pessoas com insuficiência cardíaca congestiva e suas possíveis interações medicamentosas incluem ciclosporina, triazolam, midazolam e eritromicina (Allen et al., 2015; Piérard et al., 2000).

As equinocandinas, como a caspofungina, a micafungina e a anidulafungina, representam uma nova classe de medicamentos antifúngicos, que agem interferindo na síntese da parede celular das espécies de *Candida*. Não são bem absorvidas pelo trato gastrointestinal, portanto, devem ser administradas por via intravenosa e não são indicadas para o tratamento da EP, apenas para infecções mais graves (Neville et al., 2016; Vandeputte et al., 2012).

Métodos inovadores têm sido propostos para a prevenção e tratamento da EP, como a incorporação de agentes antimicrobianos em resinas acrílicas para próteses, e o uso de materiais reembasadores antifúngicos, que têm se mostrado promissores na inibição de biofilmes de *Candida* (Bueno et al., 2017). Abordagens naturais, como a adição de extratos de plantas e uso de probióticos têm sido

exploradas para aprimorar as propriedades antimicrobianas das próteses (de Araújo et al., 2021; Ninomiya et al., 2012; Ribeiro et al., 2020; Sugio et al., 2020).

A escolha entre abordagens terapêuticas individuais ou sua combinação deve ser considerada caso a caso, levando em conta a redução de microrganismos na mucosa infectada e nas superfícies da prótese. No entanto, a eficácia desse tratamento torna-se limitada e uma rápida recorrência da infecção pode ocorrer após a suspensão do medicamento, a menos que haja uma melhoria na higiene da prótese e uma redução da contaminação por *Candida* nas superfícies da prótese. Portanto, é importante salientar que o tratamento terapêutico não substitui o cuidado protético completo, mas atua em conjunto com outros fatores. A terapia medicamentosa é considerada um complemento para pacientes com EP (Bueno et al., 2017; Emami et al., 2014; Gendreau, Loewy, 2011; Zegarelli et al., 1961).

A resistência a medicamentos antifúngicos é uma grande preocupação, e a perda de eficácia em tratamentos reduz drasticamente as opções terapêuticas disponíveis. A disponibilidade de agentes antifúngicos é restrita em comparação com antibióticos, devido ao fato de que os fungos são organismos eucarióticos que parasitam hospedeiros eucarióticos. A estreita diferença fisiológica entre eles dificulta o desenvolvimento de agentes antifúngicos seguros e de amplo espectro. (Berman, Krysan, 2020; Shukla et al., 2016). Além disso, os efeitos colaterais adversos dos medicamentos, como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, podem limitar sua utilização em pacientes que necessitam de tratamento contínuo (Alves et al., 2020).

Entretanto, a crescente resistência a esses medicamentos tem motivado a busca por abordagens alternativas e combinadas (Bajunaid et al., 2022). Para superar estes obstáculos, diversos polímeros estão sendo estudados para aplicação como biomateriais, os quais, por definição, são substâncias, naturais ou sintéticas, elaboradas para interagir com sistemas biológicos e direcionar o tratamento médico.

## **2.4 Biomateriais e *drug delivery***

Paul Ehrlich, um cientista renomado dos séculos XIX e XX, desenvolveu um conceito inovador amplamente estudado hoje: os sistemas de entrega de

medicamentos, também conhecidos como *drug delivery*. Ele concebeu as “balas mágicas”, substâncias químicas específicas capazes de serem direcionadas para combater seletivamente patógenos, como bactérias ou parasitas, sem prejudicar significativamente as células saudáveis hospedeiras. Esse conceito influenciou de maneira significativa a busca por tratamentos direcionados e específicos em várias áreas médicas (Winau et al., 2004; Zipfel, Skerka, 2022).

Com avanços tecnológicos contínuos, esforços têm sido dedicados para aprimorar a eficácia dos tratamentos, permitindo a liberação localizada e controlada de medicamentos. Esses sistemas oferecem inúmeras vantagens, incluindo melhora na eficácia terapêutica, redução dos efeitos colaterais, diminuição da frequência de administração, redução da toxicidade e aumento da adesão e comodidade para o paciente (Bhatt et al., 2021; Monteiro et al., 2017; Urich et al., 1999).

A liberação e/ou distribuição de medicamentos ocorrem de duas maneiras principais: controle temporal e controle de distribuição. No controle temporal, são utilizados transportadores acoplados ao medicamento de interesse, reduzindo sua taxa de absorção e prolongando sua circulação. Isso é benéfico para medicamentos rapidamente metabolizados e eliminados após a administração. No controle de distribuição, os sistemas de entrega de medicamentos visam liberar o medicamento diretamente no local de ação dentro do corpo. A liberação controlada ocorre por mecanismos ativos (como sistemas de bomba) ou por liberação passiva (difusão controlada) em sistemas de depósito. Medicamentos em sistemas de depósito podem ser administrados na circulação ou localmente em tecidos ou órgãos específicos, evitando a eliminação inicial e reduzindo a exposição sistêmica (Frandsen, Ghandehari, 2012; Urich et al., 1999).

Polímeros empregados em sistemas de liberação de medicamentos podem ser classificados como biodegradáveis ou não biodegradáveis. Os sistemas biodegradáveis têm recebido maior atenção, pois eliminam a necessidade de recuperação ou manipulação após sua introdução no organismo (Urich et al., 1999). Tanto polímeros naturais quanto polímeros sintéticos têm sido amplamente investigados como biomateriais poliméricos biodegradáveis para serem utilizados como sistemas de *drug delivery*. Williams (2009) definiu biomaterial como uma parte de um sistema complexo, utilizado para direcionar, por meio do controle das interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento

terapêutico ou diagnóstico na medicina.

Os biomateriais naturais apresentam vantagens, como biodegradabilidade, citocompatibilidade e propriedades físicas, químicas e mecânicas singulares. Eles oferecem sítios de reconhecimento celular essenciais para a adesão e proliferação celular, por exemplo (Mondal et al., 2016). Além disso, apresentam bioatividade e capacidade de apresentar ligantes que se conectam a receptores celulares, a suscetibilidade à degradação proteolítica induzida por células e a remodelação natural. No entanto, a bioatividade inerente desses polímeros naturais traz consigo algumas desvantagens, incluindo uma resposta imunogênica acentuada associada à maioria dos polímeros, complexidades relacionadas à purificação e a possibilidade de transmissão de doenças (Nair, Laurencin, 2007).

Em contraste, os biomateriais sintéticos tendem a ser biologicamente inertes, possuem propriedades mais previsíveis e uniformes em diferentes lotes, além de apresentarem a vantagem única de ter perfis de propriedades adaptados a aplicações específicas, evitando muitas das desvantagens dos polímeros naturais. Essas considerações têm motivado a exploração de polímeros sintéticos biodegradáveis para uso em aplicações biomédicas. Os polímeros sintéticos oferecem uma flexibilidade de design excelente, já que sua composição e estrutura podem ser adaptadas para atender necessidades específicas (Nair, Laurencin, 2007).

Um dos polímeros sintéticos extensivamente estudados como matriz de liberação de fármacos atualmente, a PCL, foi descoberta por Van Natta et al. (1934). Este é um poliéster alifático biodegradável, biocompatível, hidrofóbico, semicristalino e que possui lenta degradação (cerca de dois anos) (Chandra, Rustgi, 1998; Chaparro et al., 2019; Coombes et al., 2004; Duan et al., 2007; Engelberg, Kohn, 1991; Hivenchi et al., 2018; Karuppuswamy, 2015; Liu et al., 2019; Nair, Laurencin, 2007; Sisson et al., 2013; Teoh et al., 2019; Ulery et al., 2011). Em temperatura ambiente PCL possui consistência borrachóide, propriedade incomum entre os poliésteres alifáticos. Essa característica contribui para a alta permeabilidade do polímero para muitos medicamentos (Corden et al., 1999; Duan et al., 2007; Engelberg, Kohn, 1991; Monteiro et al., 2017; Woodruff, Huttmacher, 2010).

Segundo a literatura, a PCL é o polímero mais comumente utilizado para a produção de NF pela técnica de eletrofiação (Cipitria et al., 2011; Khalf, Madihally, 2017; Woodruff, Huttmacher, 2010). Dentre as várias alternativas, as NF têm chamado

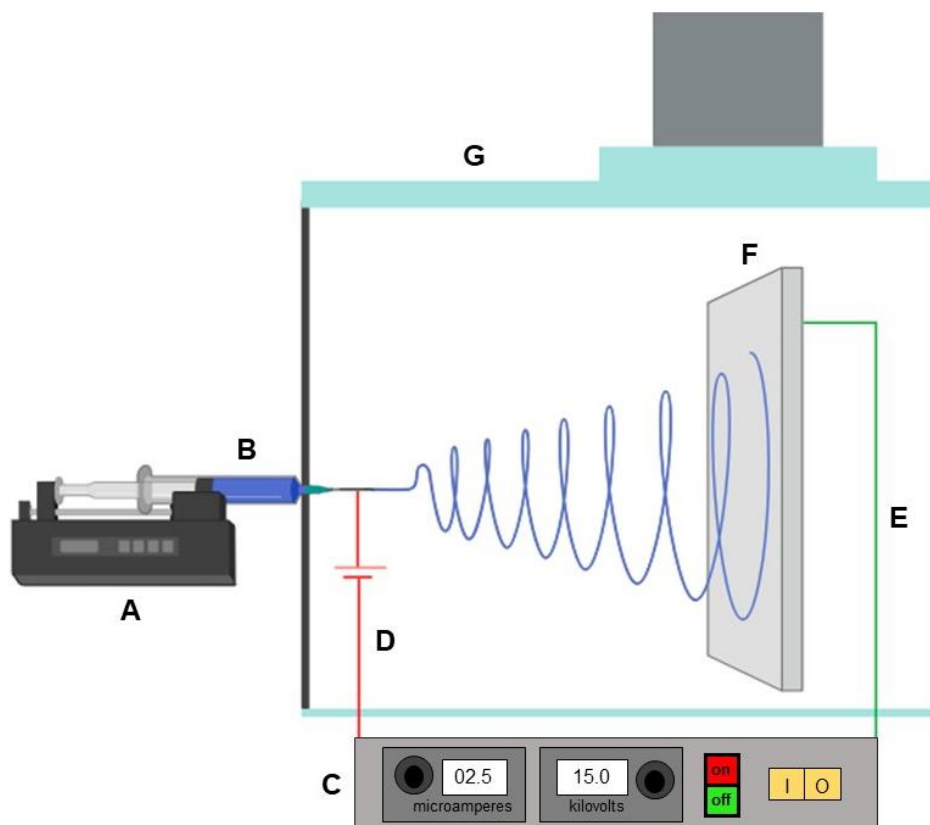
atenção devido ao seu grande potencial para composições farmacêuticas, que podem ser projetadas para fornecer dissolução rápida, imediata, retardada ou modificada, tais como características de liberação sustentada e/ou pulsátil (Huang et al., 2003).

## **2.5 Processo de eletrofiação**

O processo de eletrofiação tem suas origens na primeira metade do século XX, evidenciado por patentes como as de Cooley (1902), Morton (1902), Norton (1936) e de Formhals (1930 e 1940). Este método, conhecido por sua simplicidade, custo acessível e ampla aplicabilidade, destaca-se em diversas áreas, incluindo meio ambiente, biomedicina, energia, sensores e alimentos. Sua versatilidade possibilita a produção de nanofibras a partir de uma variedade de materiais, como polímeros sintéticos ou naturais, carbono, cerâmica, metal, ou pela combinação de um ou mais materiais. Isso resulta na obtenção de fibras com diâmetros que variam de dezenas de nanômetros a alguns micrômetros (Bhardwaj, Kundu, 2010; Chen et al., 2010; Cheng et al., 2008; Costa et al., 2012; Khalf, Madihally, 2017; Li, Xia, 2004; Mercante, Corrêa, 2023; Reneker, Yarin, 2008).

Um sistema de eletrofiação básico é composto por quatro componentes principais: uma fonte de alta tensão, uma bomba de seringa, um capilar (geralmente, uma agulha hipodérmica com ponta plana) e um anteparo coletor metálico estático ou um mandril rotatório (Figura 2).

Figura 2 – Esquema do equipamento de eletrofiação



Legenda: A) fonte ejetora da solução; B) seringa com a solução pra eletrospinning; C) fonte de alta tensão; D) fio condutor para aplicação de alta tensão, E) fio terra, F) anteparo para coletar as fibras, G) capela de eletrospinning com exaustor.

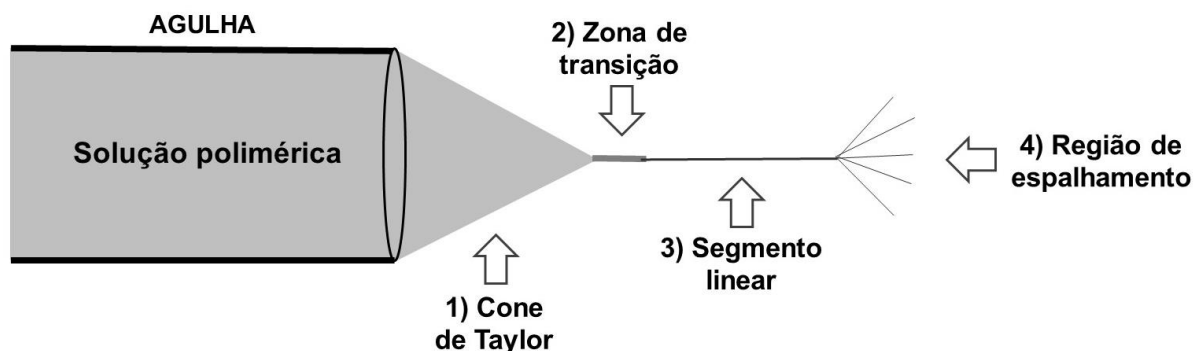
Fonte: Elaborado pela autora.

O eletrodo positivo é conectado à ponta da agulha, enquanto o negativo (ou neutro) é posicionado no coletor, estabelecendo um campo elétrico. Esse arranjo mantém a solução por tensão superficial, carregando eletricamente sua superfície. Quando a diferença de potencial supera a tensão superficial, a solução polimérica é forçada a passar pelo capilar originando uma gota, que se alonga para formar um cone, denominado cone de Taylor. O jato resultante se estreita e é direcionado ao coletor. Nessa fase, o solvente presente na solução evapora gradualmente, dando origem a uma manta de fibras não tecida que é depositada sobre um substrato (Ahmed et al., 2015; Anup et al., 2021; Huang et al., 2003; Liang et al., 2007; Rutledge, Fridrikh, 2007; Thakkar et al., 2017; Xue et al., 2019).

Costa et al. (2012) ilustra as etapas do processo de eletrospinning, incluindo a formação do cone de Taylor. Durante o alongamento e ejeção do jato, quatro regiões

distintas são formadas: cone de Taylor, a zona de transição, o segmento linear e a região de espalhamento, demonstradas na Figura 3.

Figura 3 – Representação das quatro regiões do jato da solução



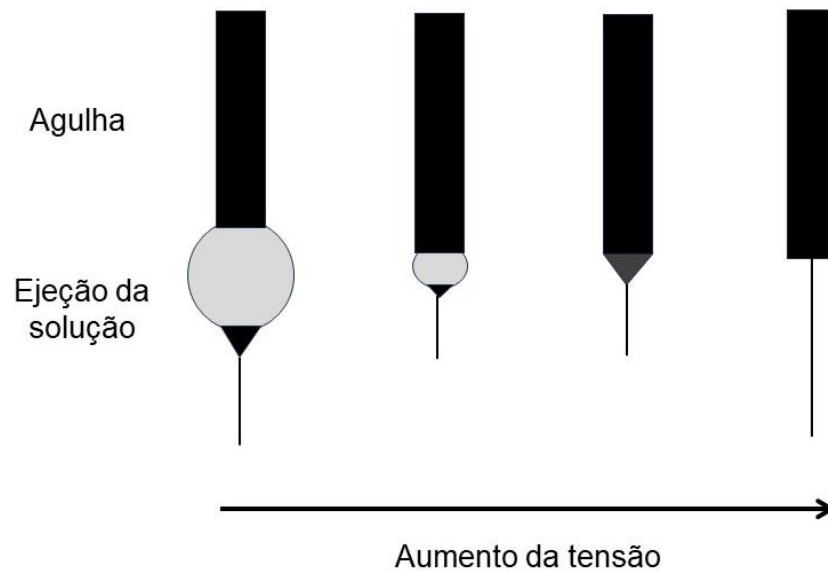
Fonte: Adaptado de Costa et al. (2012).

Neste processo, é possível otimizar as propriedades das fibras eletrofiadas, o que pode impactar positivamente o seu desempenho final, que é possível com o ajuste adequado dos diferentes fatores envolvidos. Entre os parâmetros do processo, encontram-se a voltagem utilizada, razão de fluxo com que a solução polimérica é ejetada, diferença de potencial gerada no campo elétrico e distância da ponta da agulha ao coletor. Enquanto os parâmetros da solução compreendem o tipo de solvente utilizado, tipo de solução, bem como a condutividade elétrica, viscosidade e tensão superficial da solução. Por fim, parâmetros ambientais, como a temperatura e umidade também exercem influência (Costa et al., 2012; Cramariuc et al., 2013; Demir et al., 2002; Fadil et al., 2021; Huang et al., 2003; Pillay et al., 2013; Rutledge, Fridrikh, 2007; Zhang et al., 2013).

O diâmetro das fibras é influenciado pela tensão aplicada durante o processo. Huang et al. (2003) afirmam que um aumento na tensão resulta em um jato de solução com maior volume e, conseqüentemente, maior diâmetro final das NF. Enquanto Heikkilä e Harlin (2008) destacam que a tensão desempenha um papel crucial na formação do jato da solução polimérica, que se move da agulha para o coletor. Se a tensão for muito baixa, não será suficiente para superar a tensão superficial da

solução, resultando no gotejamento da solução na ponta da agulha em vez de seu alongamento, como ilustrado na Figura 4.

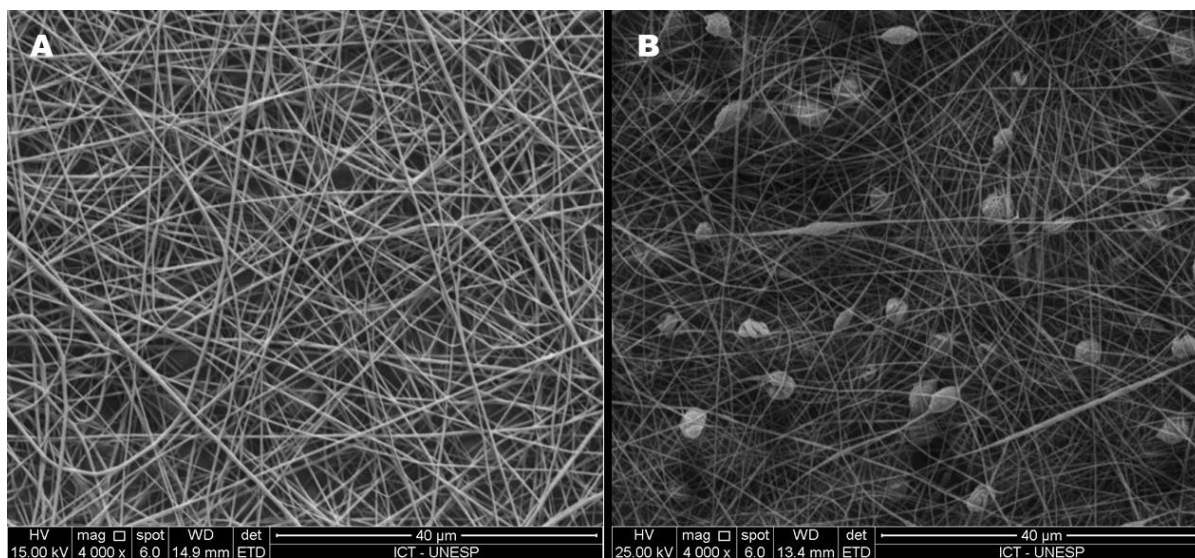
Figura 4 - Efeito da variação da tensão na formação do Cone de Taylor



Fonte: Adaptado de Sill e Recum (2008).

Se a tensão aplicada for excessivamente alta, o jato formado não será uniforme, levando à geração de nanofibras com diâmetros variados e podendo ocorrer a formação de defeitos em formato de contas ao longo das fibras, conhecidos como *swab* (Figura 5).

Figura 5 – Micrografias de nanofibras poliméricas



Legenda: A) NF sem defeitos ou com a presença de *beads*; B) NF contendo *beads* em sua formação. Aumento 4000x.

Fonte: Elaborado pela autora.

A distância entre a ponta da agulha e o coletor é segundo principal fator que influencia a formação das fibras. Conforme Heikkilä e Harlin (2008), se essa distância for muito grande, o campo elétrico formado não será suficientemente forte, podendo resultar na perda de muitas fibras que não alcançarão o coletor. Isso pode prejudicar a produtividade e levar ao desperdício de matéria-prima. Por outro lado, se a distância for muito pequena, não haverá espaço adequado para a evaporação do solvente e, um valor máximo para que o campo elétrico seja efetivo na estabilização do cone de Taylor, resultando na formação de *beads* (Costa et al., 2012; Gao et al 2022). Mercante, Corrêa (2023) também destacam que a deposição no coletor ainda úmidas geralmente leva à formação de fibras achatadas ou até mesmo à formação de um filme contínuo.

A razão de fluxo do polímero da seringa é um parâmetro importante do processo, pois influencia a velocidade do jato e a taxa de transferência do material (Bhardwaj, Kundu, 2010). Aumentar a velocidade de injeção da solução levará à expansão do diâmetro do jato, o que aumenta o diâmetro da fibra, enquanto uma velocidade de injeção da solução muito lenta pode impedir a formação de fibras ou levar à descontinuidade da fibra (Gao et al., 2022, Husain et al., 2016). Zhang et al.

(2013) destacam que uma razão de fluxo muito elevada leva a uma quantidade maior de solução atingindo a ponta da agulha, tornando difícil a ejeção uniforme devido à alta diferença de potencial. Isso resulta em nanofibras instáveis, com possível formação de *beads*.

As propriedades do solvente utilizado têm um efeito importante no processo de eletrofiação. O solvente deve ser capaz de dissolver o polímero em concentrações adequadas e apresentar volatilidade apropriada para permitir a formação de fibras (Gao et al., 2022; Pillay et al., 2013). Geralmente, os solventes voláteis são a escolha preferida, pois facilitam a desidratação das nanofibras durante a trajetória da ponta capilar até a superfície do coletor possuindo rápida taxa de evaporação. Soluções preparadas a partir de solventes com volatilidade muito baixa podem resultar em fibras úmidas e achatadas, formação de filmes ou até mesmo impedir o processo de eletrofiação. No entanto, solventes altamente voláteis devem ser evitados, pois podem evaporar na ponta do capilar e, assim, resultar em entupimento e obstrução do fluxo da solução de polímero (Pillay et al., 2013; Mercante, Corrêa, 2023; Xue et al., 2019).

A viscosidade, concentração de polímero e peso molecular do polímero estão correlacionados entre si e desempenham um papel importante na determinação do tamanho e da morfologia das fibras. Soluções com viscosidade muito baixa podem resultar na falta de formação contínua de fibras, enquanto viscosidades muito altas dificultam a ejeção dos jatos da solução polimérica, pois uma maior viscosidade requer forças elétricas mais intensas para superar a tensão superficial e a força viscoelástica necessária para alongar as fibras (Bhardwaj, Kundu, 2010; Costa et al., 2012; Demir et al., 2002; Huang et al., 2003; Rutledge, Fridrikh, 2007).

Além disso, a concentração do polímero na solução é um fator determinante. Baixa massa molar e/ou baixa concentração polimérica podem resultar em menor viscosidade, levando a menor estabilidade dos jatos de solução polimérica, o que pode favorecer a formação de fibras com menores diâmetros e a ocorrência de defeitos na estrutura das fibras, inclusive a ruptura do jato, promovendo o processo de eletropulverização, em vez da eletrofiação. Por outro lado, soluções com viscosidade muito elevada podem resultar em fibras com maiores diâmetros e podem levar ao entupimento do capilar, interrompendo o processo de eletrofiação, especialmente em solventes voláteis (Costa et al., 2012; Mercante, Corrêa, 2023).

Segundo Gao et al. (2022), temperaturas mais baixas reduzem a volatilização do solvente, resultando na solidificação incompleta das fibras. Por outro lado, temperaturas elevadas aceleraram a evaporação, gerando fibras contínuas, mas temperaturas excessivamente altas podem obstruir a agulha.

A umidade relativa também influencia, sendo que em ambientes úmidos, polímeros hidrofóbicos podem formar poros na superfície das fibras durante a eletrofiação, além de *beads* (Mercante, Corrêa, 2023).

Temperaturas mais baixas retardam a volatilização do solvente, resultando em solidificação incompleta das fibras. Em contraste, temperaturas mais altas aceleram a evaporação, gerando fibras contínuas, mas temperaturas excessivamente altas podem obstruir a agulha.

## 2.6 Estudo em modelos animais

A necessidade de se estabelecer um protocolo padrão para o tratamento da EP, dada à sua elevada taxa de recorrência, tem impulsionado a busca por novas abordagens terapêuticas. Antes de iniciar estudos clínicos, é crucial garantir a segurança e eficácia de tratamentos inovadores (Adam, Khan, 2021; de Souza et al., 2021; Moraes et al., 2021). Atualmente muito utilizados, os métodos alternativos, como o embrião de galinha, *zebrafish*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella*, apresentam boa correlação com modelos animais, dispensando a necessidade de instalações ou pessoal especializado para manutenção (Brunke et al., 2015; Figueiredo-Godoi 2019; Jacobsen et al., 2011; Tobin et al., 2012).

Embora esses modelos possam servir como ferramenta de triagem para avaliar a virulência de linhagens mutantes ou testar novos medicamentos antifúngicos, os modelos animais ainda são considerados o padrão-ouro na maioria das infecções fúngicas e continuam a ser fundamentais para o avanço da micologia médica (Alcazar-Fuoli et al., 2015; Brunke et al., 2015; Capilla et al., 2007; Jacobsen et al., 2011; Maciel Quatrin et al., 2019).

A utilização de pesquisas com animais remonta a milênios na história da humanidade. Por volta de 1865, princípios do uso de animais como modelo foram

estabelecidos e buscou-se criar regras e princípios para pesquisas médicas experimentais (Fagundes, Taha, 2004). Os modelos animais desempenham um papel crucial na pesquisa biomédica, aprimorando a compreensão das doenças ao permitir o estudo de sua origem, progressão e tratamento em um ambiente mais complexo do que os estudos *in vitro*. Contribuem para o desenvolvimento e avaliação de terapias e medicamentos, superando as limitações dos ensaios clínicos em humanos. A escolha de um modelo animal deve levar em consideração as semelhanças biológicas com seres humanos (Andersen, Winter, 2019; Baxter, Griffin, 2016; Hau, 2008; Khorramizadeh, Saadat, 2020; Stevens et al., 2020; Yu et al., 2020).

Inicialmente, estudos de Budtz-Jorgensen (1971) e Olsen e Haanaes (1977) utilizaram primatas para investigar a *Candida* na EP. Apesar de teoricamente macacos serem considerados um bom modelo animal devido à sua microbiota oral semelhante à dos seres humanos, à capacidade de utilizar e tolerar placas de acrílico que simulam PTs na cavidade bucal e à susceptibilidade a infecções relacionadas à *Candida*, foram descontinuados devido aos altos custos e complexidades associados.

Ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*) representam uma alternativa na pesquisa biomédica, compartilhando cerca de 97,5% do seu DNA funcional com os seres humanos, o que representa apenas um por cento a menos que a compatibilidade dos macacos. Além disso, podem ser submetidos a rigorosos controles genéticos e ambientais (Kuramoto, 2023; New Scientist Magazine, 2022).

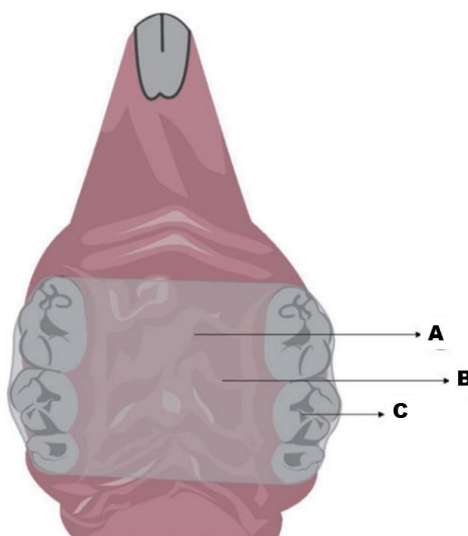
A facilidade de manipulação, o baixo custo de manutenção, o grande tamanho corporal e cavidade bucal suficientemente grande tornam esses animais ideais para experimentos. Eles também apresentam padrões de colonização e lesões de candidose oral semelhantes aos observadas em humanos, tanto microscopicamente quanto histologicamente (Jones, Adams, 1970; Olsen, Bondevik, 1978; Samaranayake, Samaranayake, 2001).

A utilização de dispositivos intraorais que simulam próteses dentárias em modelos murinos desempenha o importante papel de facilitador do desenvolvimento da infecção fúngica. O epitélio palatal, revestido por uma camada densamente cornificada de queratina, inicialmente impede a retenção das células de *Candida*. No entanto, os metabólitos e a baixa concentração de oxigênio sob os dispositivos de resina acrílica podem promover a formação de hifas e sua penetração nos tecidos (Fisker et al., 1982; Philipsen et al., 1982; Shakir et al., 1981). Diferentes designs e

técnicas de fabricação foram propostas ao longo dos anos para viabilizar o uso de dispositivos intraorais em roedores, visando a subsequente indução da EP. Estudos empregaram, por exemplo, dispositivos de resina acrílica com uma banda de aço ao redor dos incisivos fixada com resina autopolimerizante, porções fixas e removíveis com ímãs, dispositivos fixados com fios ortodônticos, dispositivos de resina acrílica reembasados e cimentados com resina composta (Bail et al., 2014; Jennings, MacDonald, 1992; Johnson et al., 2012; Nett et al., 2010; Moraes et al., 2022).

Hotta et al. (2017) observou que o recobrimento total do palato e a presença de fios metálicos nos dispositivos geravam um significativo estresse nos animais, levando à perda de peso. Como solução desenvolveu um dispositivo intraoral de resina acrílica termicamente ativada rosa, que cobria apenas a região posterior do palato e era cimentado na região dos molares, possibilitando reembasamento, quando necessário, visando sua aplicação em estudos *in vivo*. Essa modificação visava reduzir a perda dos dispositivos ao longo dos experimentos. Moraes et al. (2021) adaptaram essa metodologia ao propor o uso de resina acrílica incolor para a confecção dos dispositivos palatinos, permitindo uma melhor visibilidade durante sua adaptação e fixação. Esses dispositivos foram cimentados com um cimento resinoso autoadesivo (Figura 6).

Figura 6 – Ilustração esquemática do dispositivo palatino



Legenda: A) Dispositivo de acrílico cobrindo apenas a porção posterior do palato duro; B) confeccionado com resina acrílica incolor termopolimerizável; C) cimentados com cimento resinoso autoadesivo, que foi inserido na região molar bilateralmente.  
Fonte: Moraes et al (2021).

Sultan et al. (2019) desenvolveu um dispositivo intraoral digitalmente, utilizando um software para scanear um modelo mestre do palato do rato. Posteriormente, esse modelo foi impresso em 3D em resina translúcida. Após a instalação do dispositivo nos animais, uma suspensão de células de *C. albicans* foi introduzida através de um reservatório entre o dispositivo e o palato para estabelecer a infecção. Os dispositivos foram fixados com adesivo e resina fluida fotopolimerizada. Um hidrogel baseado em peptídeos antimicrobianos, foi empregado, revelando-se potencial um agente profilático seguro e viável contra a EP, porém ineficaz na eliminação de biofilmes pré-formados nos dispositivos infectados.

Considerando o conhecimento sobre a EP em seres humanos, acredita-se que um modelo animal eficaz deve integrar de forma equilibrada os fatores ao longo de um intervalo de tempo significativo, a fim de replicar com precisão a condição clínica humana (Moraes et al., 2022).

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do tratamento de mantas de NF eletrofiadas do polímero PCL incorporadas do antifúngico NIS sobre biofilmes *in vitro* de *C. albicans* e em EP induzida em modelos animais.

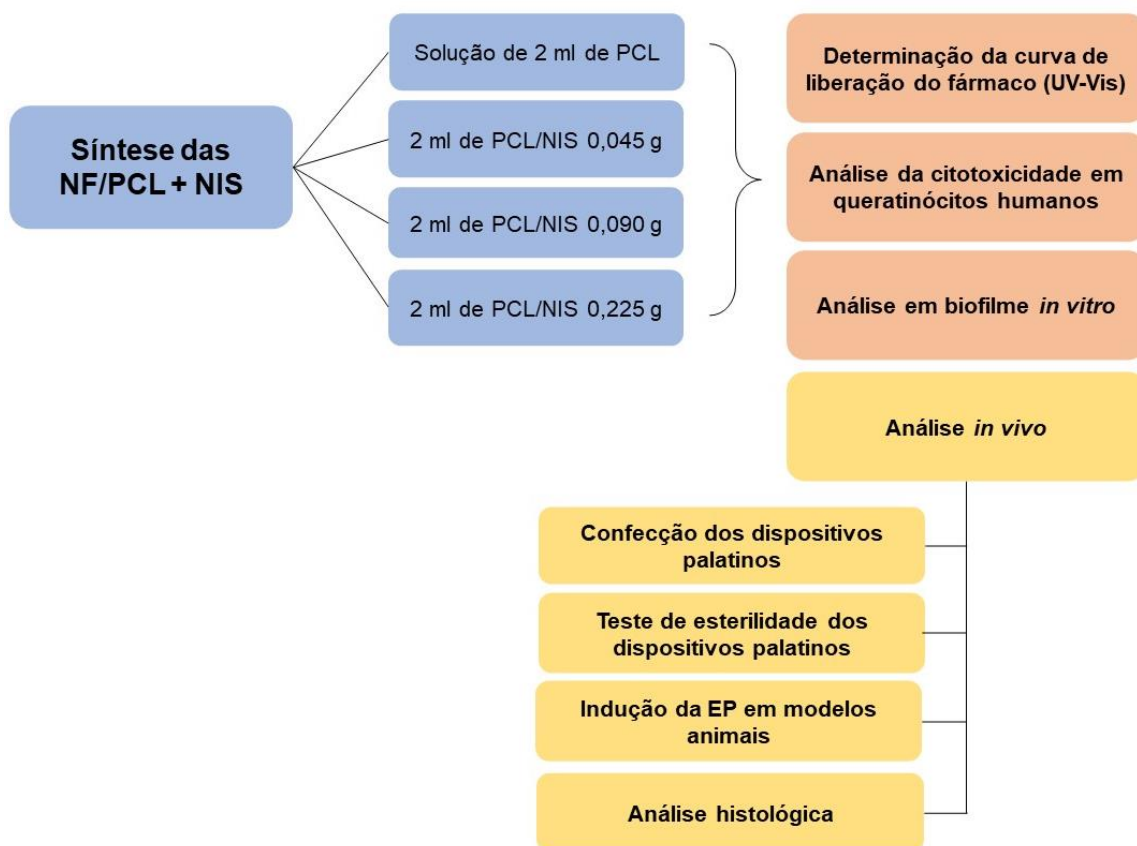
#### 3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar mantas de NF de PCL puro e de PCL com adição de NIS;
- Determinar a curva de liberação do antifúngico;
- Avaliar a citotoxicidade das mantas com e sem adição de NIS através da análise de viabilidade celular em queratinócitos humanos;
- Avaliar a atividade das mantas em biofilme *in vitro* de *C. albicans*;
- Explorar os efeitos da manta com adição de NIS na EP experimental, utilizando modelos animais.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste estudo está ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma da metodologia do trabalho



Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.1 Síntese das nanofibras

#### 4.1.1 Proporcionamento das soluções

A proporção das soluções foi previamente definida por Santos (2020). Foram dissolvidas 1,8 g de pellets do polímero PCL (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) em 4,05 mL dos solventes N,N-dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) e 1,1,2,2-tetracloroetano (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). Esta solução foi mantida em agitação constante por 24 h em agitador magnético (IKA RH Basic, Staufen, Alemanha). Em seguida, três concentrações de NIS foram adicionadas na solução de PCL (PCL/NIS), resultando-se em quatro soluções diferentes, conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Proporção das soluções de PCL e NIS

<b>Proporção PCL (mL)</b>	<b>Proporção NIS (g)</b>	<b>Solução</b>
2	Não foi adicionada	PCL
2	0,045	PCL/NIS 0,045 g
2	0,090	PCL/NIS 0,090 g
2	0,225	PCL/NIS 0,225 g

Fonte: Santos (2020).

#### 4.1.2 Técnica da eletrofiação

Para a síntese das NF de PCL com adição do antifúngico NIS foi utilizado o equipamento de eletrofiação (obtido por meio do processo FAPESP 2014/00668-4) do laboratório de Bioengenharia e Biomateriais do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP. Os parâmetros utilizados neste trabalho foram definidos previamente por Santos (2020) e estão demonstrados no Quadro 2.

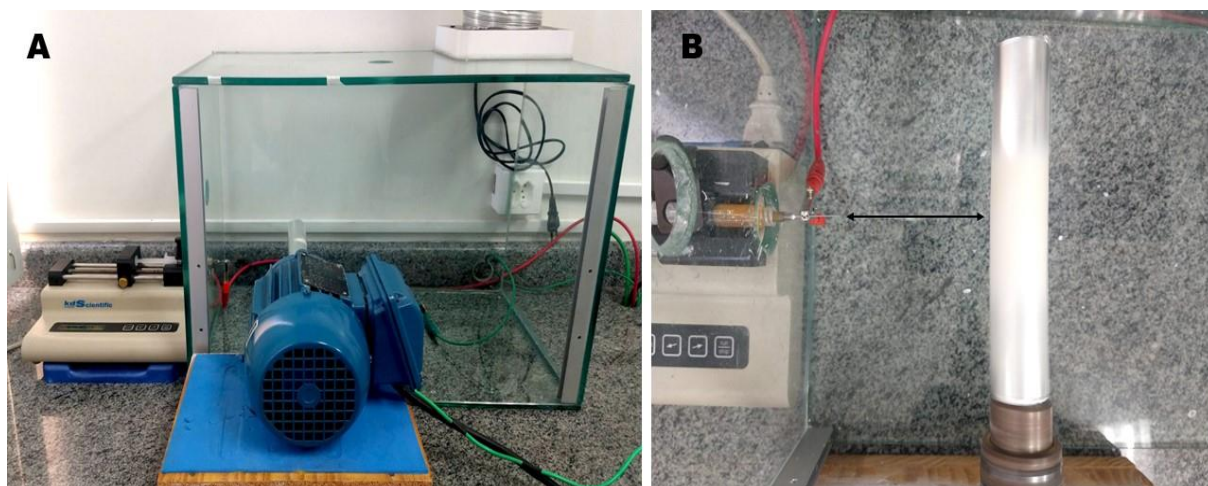
Quadro 2 – Parâmetros da eletrofiação

Solução	Distância (cm)	Vtagem (kV)	Fluxo (mL/ h)
PCL	8	15	0,5
PCL/NIS 0,045 g	8	13	0,5
PCL/NIS 0,090 g	8	13	0,5
PCL/NIS 0,225 g	8	15	0,5

Fonte: Santos (2020).

As membranas de NF foram coletadas de maneira desalinhada com auxílio de motor elétrico (WEG S.A., Jaraguá do Sul, SC, Brasil), com 600 rpm, e o dispositivo cilíndrico giratório com folha de papel alumínio, onde foram depositadas (Figura 8).

Figura 8 – Sistema preparado para eletrofiação



Legenda: A) Sistema montado para eletrofiação; B) Distância entre agulha e coletor.  
Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.2 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

### 4.2.1 Curva padrão da nistatina

A curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de NIS diluída em DMF (10000 µg/ mL). Para tanto, concentrações variando de 9,76 a 312,50 µg/ mL foram dispensadas nos poços de placas de 96 poços UV-transparentes e analisadas em espectrofotômetro (Epoch, Biotek Instruments, Winoosk, EUA) no comprimento de onda de 310 nm.

#### **4.2.2 Cinética da liberação da nistatina**

A liberação de NIS das formulações de PCL/NIS foi determinada em parceria com a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus de São José dos Campos. Para isso, uma amostra de 1 x 2 cm das quatro mantas de PCL/NIS foi colocada em tubos Falcon contendo 10 mL de Solução Salina Fosfato (PBS) e incubada a 37 °C com agitação (100 rpm). A análise foi realizada em triplicata nos seguintes tempos: 0 h, 6 h, 10 h, 24 h, 30 h, 34 h, 200 h e 320 h. Para cada análise, foram retirados 1 mL de alíquota, e 1 mL de PBS foi adicionado para restaurar o volume inicial das amostras para 10 mL. A análise foi concluída quando nenhum antifúngico adicional foi detectado na solução. Posteriormente, a absorbância de cada alíquota foi medida a 310 nm em espectrofotômetro (Biotek Instruments, Vermont, EUA).

#### **4.3 Padronização da suspensão de *C. albicans***

Foi utilizada a cepa clínica (70) de *C. albicans* coletada da cavidade bucal de paciente HIV positivo (Junqueira et al., 2012), armazenada em estoques congelados em caldo Infuso Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion* - BHI, Himedia®, Mumbai, Índia), contendo 20% de glicerol a -80 °C, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos na Universidade Estadual Paulista – UNESP.

A cepa foi semeada em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia®, Mumbai, Índia)

com Cloranfenicol (InLab, São Paulo, Brazil) e incubada por 48 h a 37 °C em estufa bacteriológica. Após esse período, colônias características de *C. albicans* foram transferidas para o meio de semeadura caldo Yeast Extract, Peptone Dextrose (YPD, Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e mantidas a 37 °C em uma estufa agitadora (Q315IA, Quimis, São Paulo, Brasil) com frequência de 75 rpm por 24 h. A cultura do microrganismo foi centrifugada a 500 rpm por 10 min (MPW 350, Med. Instruments, Varsóvia, Polônia) e o sobrenadante desprezado. A seguir, o sedimento foi suspenso em 5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. A contagem de células fúngicas foi realizada com o uso de um hemocítmetro (Laboroptik GMBH, Bad Homburg, Alemanha), a fim de obter uma suspensão padronizada ( $1 \times 10^8$  células/ mL) (Tobouti et al., 2016).

#### **4.4 Análise das nanofibras em biofilme de *C. albicans***

Para a análise do efeito das mantas de NF em biofilme de *C. albicans*, os biofilmes foram montados no fundo dos poços das microplacas de 96 poços de forma que cada poço obteve o volume final de 200 µL de suspensão padronizada.

A seguir, microplaca foi vedada e deixada em estufa a 37 °C em agitação 75 rpm, por 90 min para fase de pré-adesão. Após a pré-adesão, o sobrenadante foi removido e os poços lavados cuidadosamente com 200 µL de PBS por 2x para retirar as células fracamente aderidas. Os poços foram novamente preenchidos com 200 µL de meio YNB (acrescido de glicose) novo, e a microplaca foi deixada por 24 h em estufa a 37 °C em agitação 75 rpm.

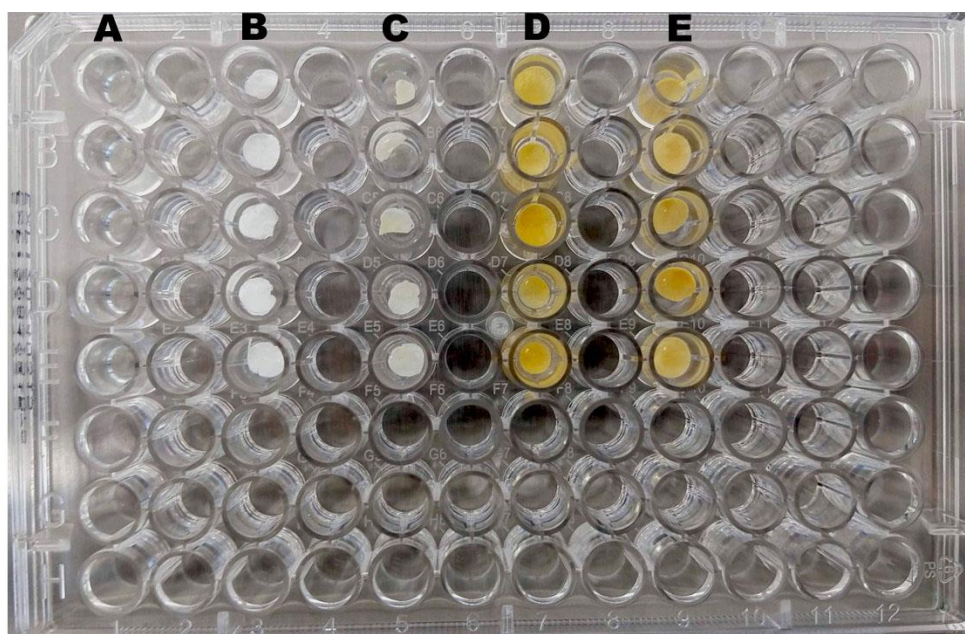
Após 24 h da formação do biofilme, o sobrenadante foi removido e os poços preenchidos novamente com 200 µL de meio YNB (acrescido de glicose) novo. Então, amostras das mantas em forma de discos com 6 mm de diâmetro, foram divididas em cinco grupos (N=5) e posicionadas bem ao fundo dos poços e a microplaca deixada por 48 h em estufa a 37 °C em agitação 75 rpm (Quadro 3 e Figura 11).

Quadro 3 - Distribuição dos grupos para análise em biofilme

Grupo	Descrição	Quantidade de NIS
Controle	Não tratado (controle negativo)	-
PCL	PCL puro (controle positivo)	-
PCL/NIS 0,045 g	PCL com adição de 0,045 g de NIS	0,34 mg
PCL/NIS 0,090 g	PCL com adição de 0,090 g de NIS	0,6 mg
PCL/NIS 0,225 g	PCL com adição de 0,225 g de NIS	1,6 mg

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9 – Disposição dos grupos na microplaca de 96 poços



Legenda: A) Controle; B) PCL; C) PCL/NIS 0,045 g; D) PCL/NIS 0,090 g; E) PCL/NIS 0,225 g.  
Fonte: Elaborado pela autora.

Após o período de tratamento de 48 h, as membranas foram removidas dos poços e o biofilme desprendido com sonificador de ponteira (Sonics Vibra Cell VCX 130, Sonics & Materials Inc, Newton, CT, EUA). Em seguida, o conteúdo de cada poço foi diluído ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  células/ mL), plaqueado juntamente com o puro em ágar Sabouraud com cloranfenicol pela técnica da gota e armazenado em estufa a 37 °C

por 48 h para posterior contagem de UFC/ mL.

#### 4.5 Análise da viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat)

A análise da viabilidade celular das membranas foi realizada no Laboratório de Estudos Interdisciplinar de Células (LEIC) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP. Por meio de teste colorimétrico de resazurina, avaliou-se a atividade enzimática celular de queratinócitos humanos (HaCat). Para reativação celular, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços na concentração de  $4 \times 10^4$  células viáveis e cultivadas em 200  $\mu$ L de meio de cultura de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Company, St Louis MO, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA) por 24 h para a aderência celular.

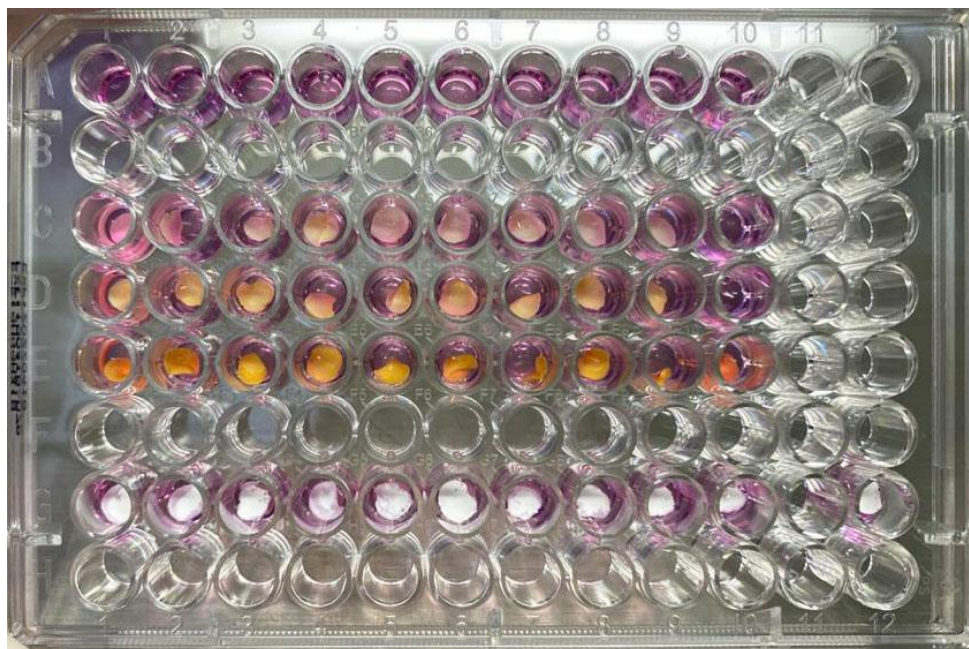
Passado o período de incubação, o meio de cultivo foi trocado e, amostras em formato de discos com 6 mm de diâmetro, foram divididas em cinco grupos, respeitando N=10, como demonstra o Quadro 4 e Figura 9.

Quadro 4 – Distribuição dos grupos para análise de citotoxicidade

<b>Grupo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Quantidade de NIS</b>
C	Controle de células (controle negativo)	–
PCL	PCL puro (controle positivo)	–
PCL/NIS 0,045 g	PCL com adição de 0,045 g de NIS	0,34 mg
PCL/NIS 0,090 g	PCL com adição de 0,090 g de NIS	0,6 mg
PCL/NIS 0,225 g	PCL com adição de 0,225 g de NIS	1,6 mg

Fonte: Elaborado pela autora.

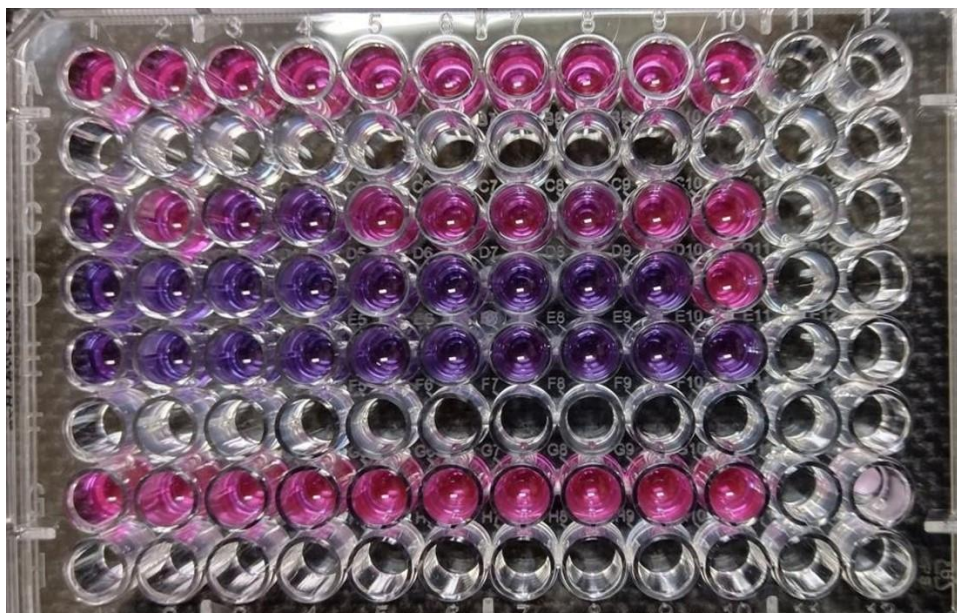
Figura 10 – Microplaca de 96 poços preparada para a análise da viabilidade celular em células HaCat



Fonte: Elaborado pela autora.

Os tratamentos foram realizados por 24 h, após este período, o meio de cultivo foi retirado e em seguida foram adicionados 10  $\mu\text{L}$ /poço da solução de resazurina (Sigma, Missouri, EUA) na concentração de 0,01%, em conjunto a 90  $\mu\text{L}$  de DMEM + 10% SFB. A microplaca de 96 poços foi incubada ao abrigo da luz (37°C, com 5% de  $\text{CO}_2$ ) por 16 h, após incubação as células com atividade metabólica possuem a capacidade de reduzir o sal de resazurina em resofurina, modificando a cor do sal de azul para rosa (Figura 10).

Figura 11 – Microplaca de 96 poços após a redução do sal de resazurina e mudança de cor



Fonte: Elaborado pela autora.

A absorvância dos poços foi lida em espectrofotômetro (Biotek Instruments, Vermont, EUA) com comprimento de onda de 570 nm e as densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

#### 4.6 Análise *in vivo*

##### 4.6.1 Modelos animais

Para o experimento *in vivo*, foram utilizados como modelos animais ratos machos Wistar albinos (*Rattus norvegicus*), com idade de 90 dias, pesando entre 300-

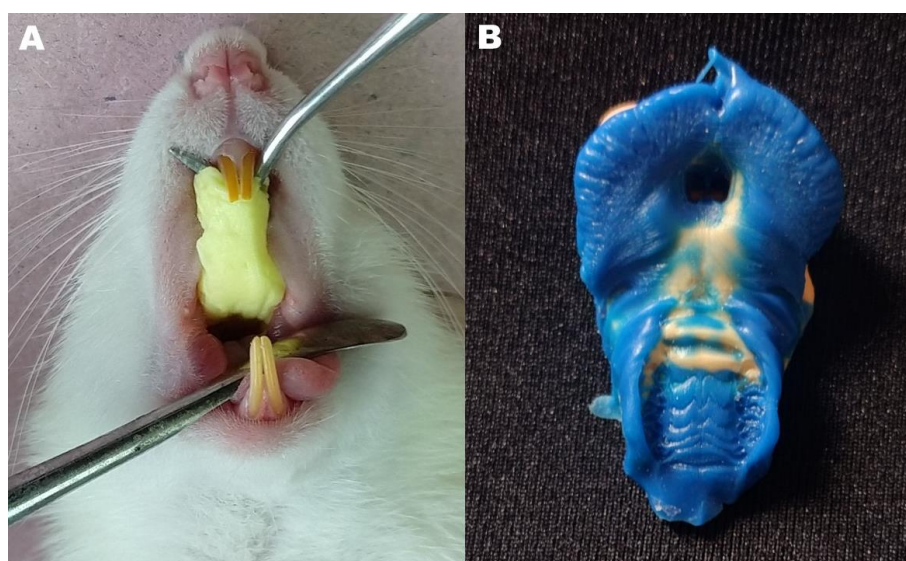
400 g provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu/UNESP. O trabalho recebeu a aprovação do Conselho de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências e Tecnologia – UNESP São José dos Campos (Protocolo 04/2021).

Todos os procedimentos intraorais foram realizados sob anestesia geral por meio de injeção intraperitoneal de 100 mg/ kg de 10% de cetamina (Cetamin; Syntec do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e 10 mg/ kg de 2% de xilazina (Xilazin; Syntec do Brasil Ltda., Brasil), relaxante muscular e sedativo de uso animal.

#### 4.6.2 Confeção dos dispositivos palatinos de resina acrílica

Para a indução da EP nos animais experimentais foram utilizados dispositivos palatinos (DP). A princípio, foi realizada a moldagem anatômica do palato de um animal sedado para a obtenção de um modelo de estudo universal, com silicone de condensação de consistência densa e leve, Optosil e Xantopren (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha), respectivamente (Figura 12).

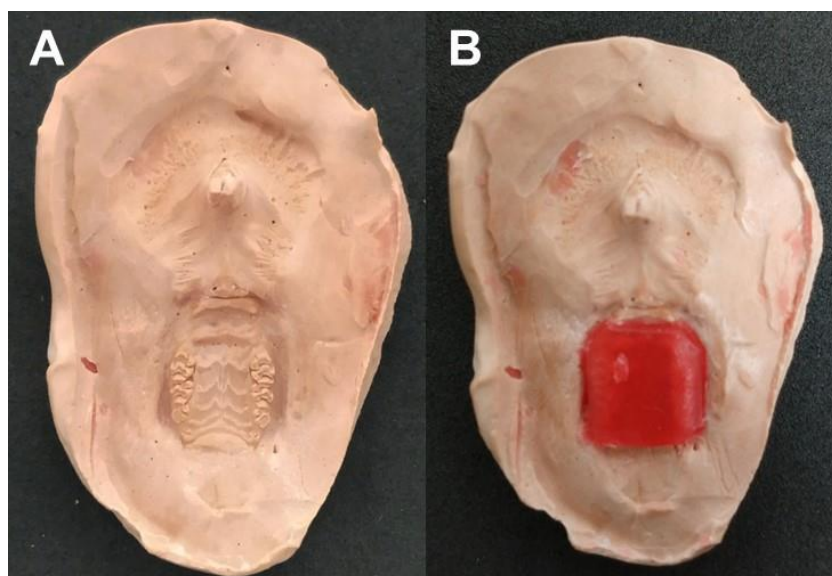
Figura 12 – Moldagem anatômica com silicone de condensação



Legenda: A) Moldagem superior com silicone de condensação de consistência pesada; B) Molde obtido após moldagem com silicone de consistência leve.  
Fonte: Elaborado pela autora.

O molde de silicone obtido foi vazado em gesso especial tipo IV (Gesso Rio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), permitindo a obtenção de um modelo de estudo. O modelo foi encerado com 1,5 mm de cera 7 (Lysanda Produtos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 13).

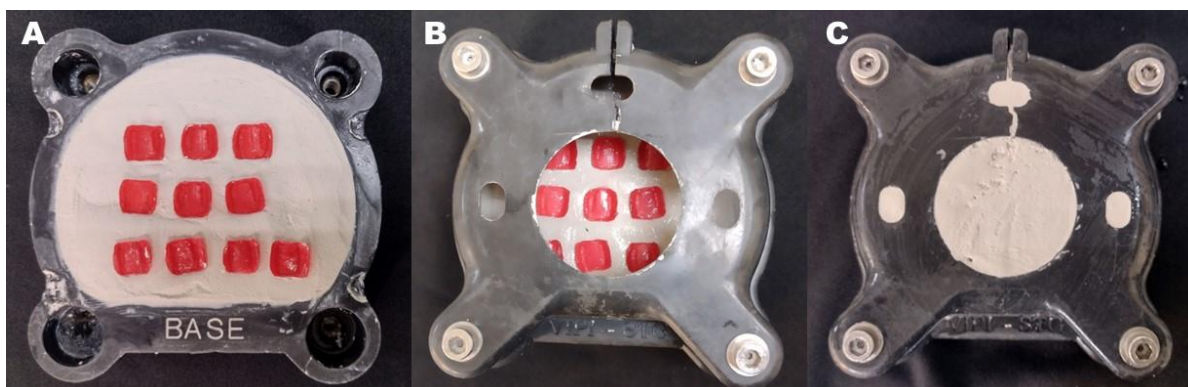
Figura 13 – Modelo anatômico obtido



Legenda: A) Modelo anatômico; B) Modelo encerado.

Então, iniciou-se a inclusão do enceramento na base de mufla plástica VIPI-STG (Vipi Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil), empregando-se gesso tipo II ou comum (Gesso Rio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na proporção 220 g de pó para 110 mL de água. A seguir, os enceramentos foram posicionados na superfície do gesso onde apenas um dos lados ficou em íntimo contato com a superfície do mesmo. Aguardada a presa do gesso (60 min), aplicou-se o isolante Dencril (Vipi Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil) e a contra-mufla foi adaptada com os parafusos travados e verteu-se o gesso tipo II na proporção de 220 g de pó, para 110 g de água, pela abertura na parte superior da mufla de forma gradativa e com o auxílio do vibrador de gesso (Figura 14).

Figura 14 – Inclusão em mufla



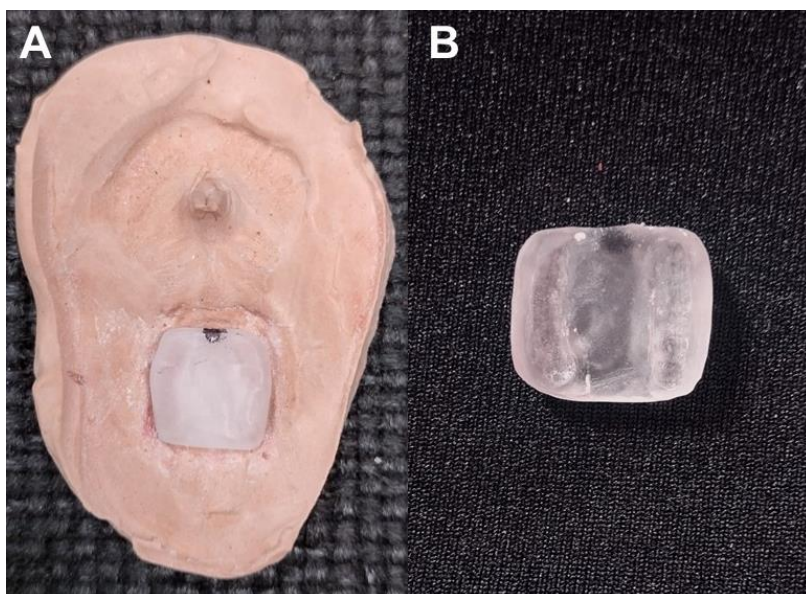
Legenda: A) Base da mufla com enceramentos incluídos; B) Contra-mufla adaptada; C) Mufla preenchida com gesso.

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a presa final do gesso, a mufla foi aberta e a cera removida. Então, a resina acrílica ativada termicamente (RAAT) incolor (Artigos Odontológicos Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil), foi proporcionada, manipulada de acordo com as recomendações do fabricante, e acomodada na mufla (em sua fase plástica), nos espaços deixados pelos enceramentos. Realizou-se a técnica da prensagem única em prensa hidráulica (Techno Máquinas) na pressão máxima de 1000 kgF. Após 30 min de descanso da mufla, foi feita a polimerização, utilizando-se o forno de micro-ondas (Continental AW-30) com prato giratório e potência máxima de 900 W. O ciclo empregado foi de 10% da potência do aparelho por 20 min acrescidos de 5 min a 60% da potência.

Após o completo resfriamento da mufla, foi realizado o acabamento da superfície da moldeira individual em resina com broca minicut (Microdont, São Paulo, SP, Brasil) para a remoção de excessos. A região de molares foi aliviada com broca esférica nº 2 (Microdont, São Paulo, SP, Brasil) para criar espaço para a moldagem funcional. O polimento foi realizado com kit de borrachas para polimento de resina acrílica (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) (Figura 15).

Figura 15 – Moldeira individual finalizada

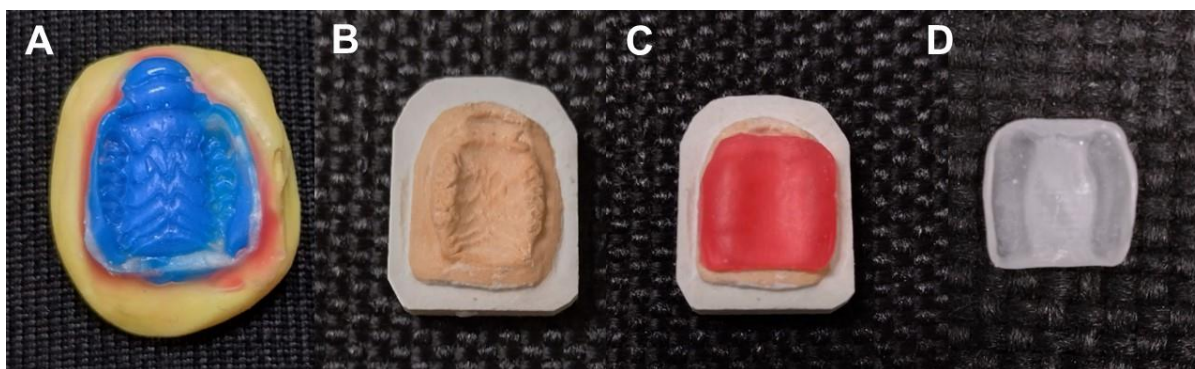


Fonte: Elaborado pela autora.

Finalizada a moldeira individual, partiu-se para a próxima etapa da confecção dos dispositivos palatinos, a moldagem funcional e obtenção do modelo de trabalho. Esta foi realizada da mesma forma, com o animal sedado com uma injeção intraperitoneal com 100 mg/ kg de cetamina 10% (Cetamin, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) associada a 10 mg/ kg de xilazina 2% (Xilazin, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e, utilizou-se silicone de condensação de consistência leve, Xantopren (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha).

A seguir, o molde de silicone foi vazado em gesso especial tipo IV (Gesso Rio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), obtendo-se o modelo de trabalho. O moldelo foi encerado com 1,5 mm de cera 7 (Lysanda Produtos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil), incluídos em mufla obedecendo-se os passos descrito acima, resultando nos dispositivos palatinos. O acabamento novamente foi feito com broca minicut (Microdont, São Paulo, SP, Brasil) para a remoção de excessos, a região de molares foi aliviada com broca esférica nº 2 (Microdont, São Paulo, SP, Brasil) para criar espaço para cimentação em boca e o polimento foi realizado com kit de borrachas para polimento de resina acrílica (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), como demonstrado na Figura 16.

Figura 16 – Passos para obtenção do dispositivo palatino



Legenda: A) Molde realizado com silicone de consistência leve; B) Modelo de trabalho; C) Enceramento com cera 7; D) Dispositivo finalizado após acabamento e polimento.

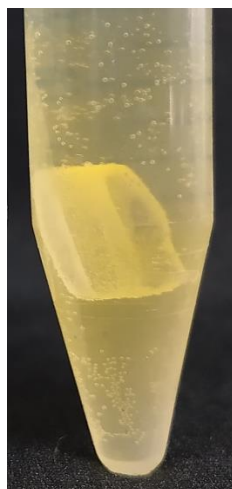
Fonte: Elaborado pela autora.

Após a finalização do acabamento e polimento, a região aliviada dos dentes molares recebeu como tratamento de superfície o jateamento com partículas de 50  $\mu\text{m}$  de óxido de alumínio (Bio-art, São Carlos, São Paulo, Brasil), utilizando-se jateadora Sandblaster III (Trijato Goldline, Araraquara, São Paulo, Brasil).

#### 4.6.3 Análise da esterilidade dos dispositivos palatinos

Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia de Moraes (2018) com algumas modificações. Dez DP foram divididos em dois grupos (N=5): controle negativo, não estéril (CN) e estéril (UV). O grupo UV foi esterilizado com luz ultravioleta por 15 min cada lado. A seguir, os dispositivos foram imersos em tubos Falcon de 15 mL com 5 mL de caldo BHI e homogeneizados em vórtex por 30 s (Figura 17).

Figura 17 – Dispositivo palatino armazenado em tubo Falcon



Fonte: Elaborado pela autora.

Os tubos Falcons foram avaliados visualmente de acordo com a turvação do meio e uma alíquota de 150  $\mu$ L dos caldos foi transferida para uma microplaca de 96 poços para análise em espectrofotômetro de microplacas (Epoch, Biotek Instruments, Winoosk, EUA) a 450 nm.

Após essa primeira leitura, foram adicionados 50  $\mu$ L do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) em cada poço para verificação da viabilidade microbiana. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.6.4 Administração de tetraciclina

Os animais receberam cloridrato de tetraciclina (Terramicina, Pfizer Inc, Nova Iorque, EUA) na água de beber, administrado na concentração de 0,83 mg/ mL, iniciado 7 dias antes da infecção e mantido até o final do experimento. A administração de tetraciclina foi realizada de acordo com Rossoni et al. (2015) e a água foi mantida *ad libitum*.

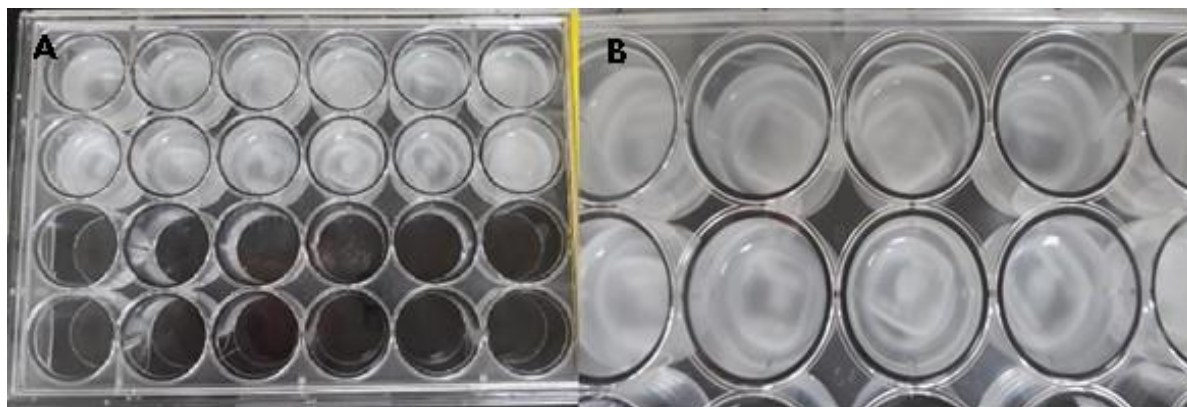
#### **4.6.5 Modificações na dieta alimentar**

Visando o conforto dos animais durante sua alimentação, além de minimizar o acúmulo de detritos alimentares na cavidade bucal, durante o uso dos DP, os animais não foram alimentados com ração sólida como é comumente recomendado. Baseando-se em Hotta (2013), os animais receberam uma dieta pastosa, onde a ração foi triturada até a consistência de pó e misturada a água. A quantidade da mistura foi baseada no consumo diário de ração na fase adulta (22 g) e foi iniciada três dias antes da instalação para a adaptação dos animais.

#### **4.6.6 Formação dos biofilmes de *C. albicans* nos dispositivos palatinos**

Para a adesão do biofilme, os DP foram primeiramente esterilizados em luz ultravioleta por 15 min cada lado. Então, 2 mL da suspensão padronizada ( $1 \times 10^8$  células/ mL) de *C. albicans* em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, DFICO, São Paulo, Brazil) acrescido de Dextrose (InLab, São Paulo, Brazil) foram adicionados em uma microplaca de 24 poços. Os dispositivos foram dispostos nos poços com a porção externa voltada para baixo. As microplacas de cultura foram acondicionadas em uma estufa agitadora a 75 rpm a 37 °C por 90 min, para pré-adesão (Figura 18).

Figura 18 – Microplacas de 24 poços com dispositivos palatinos imersos em suspensão padronizada de *C. albicans*



Legenda: DP dispostos na microplaca de 24 poços para adesão do biofilme.  
Fonte: Elaborado pela autora.

Em seguida, para eliminar células fracamente aderidas ao biofilme, os dispositivos foram lavados suavemente em poços com 2 mL de solução salina estéril, por 2 vezes (Moraes et al., 2021). Por fim, os dispositivos foram colocados em poços contendo 2 mL de caldo YNB novo e mantidos em estufa agitadora a 75 rpm a 37 °C por 24 h para formação do biofilme (Figura 19).

Figura 19 – Microplacas de 24 poços com dispositivos palatinos após troca de meio de cultura



Legenda: DP com biofilme aderido.  
Fonte: Elaborado pela autora.

#### **4.6.7 Verificação da colonização natural por *Candida spp.* na cavidade bucal dos animais**

Antes de iniciar a indução da EP por *C. albicans* foi verificada a colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de todos os animais. Com o auxílio de um *swab* estéril (Neolab Import, São José dos Pinhais, PR, Brasil) embebido com solução salina estéril, foi coletada uma amostra da cavidade bucal de todos os animais, principalmente da região palatina. A amostra foi imediatamente semeada em placas com meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida* (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e foram incubadas a 37 °C por 48 h. Após esse período, as placas foram analisadas e o crescimento de colônias de *Candida* foi observado.

#### **4.6.8 Inoculação da suspensão de *C. albicans* na cavidade bucal dos animais**

Para garantir a indução da infecção, com os animais sedados, um *swab* estéril (Neolab Import, São José dos Pinhais, PR, Brasil) embebido em suspensão padronizada de *C. albicans* ( $1 \times 10^8$  células/ mL) foi passado por todo o palato do animal por 30 s previamente a instalação dos DP.

#### **4.6.9 Divisão dos tratamentos**

Dezoito ratos foram distribuídos em três grupos (N=6), com base no tratamento recebido: controle, sem tratamento, PCL/NIS 0,045 g e, PCL/NIS 0,225 g, como mostrado no Quadro 5.

Quadro 5 – Divisão dos grupos de tratamento

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Tempo de contaminação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Tempo de tratamento</b>
C	6	48 h	Controle DP sem tratamento	48 h
B1	6	48 h	Biomaterial 1 DP + PCL/NIS 0,045 g	48 h
B2	6	48 h	Biomaterial 2 DP + PCL/NIS 0,225 g	48 h

Fonte: Elaborado pela autora.

Para o tratamento, discos de mantas de NF com 6 mm de diâmetro foram posicionados no palato do DP, que permaneceram em íntimo contato com o palato dos animais.

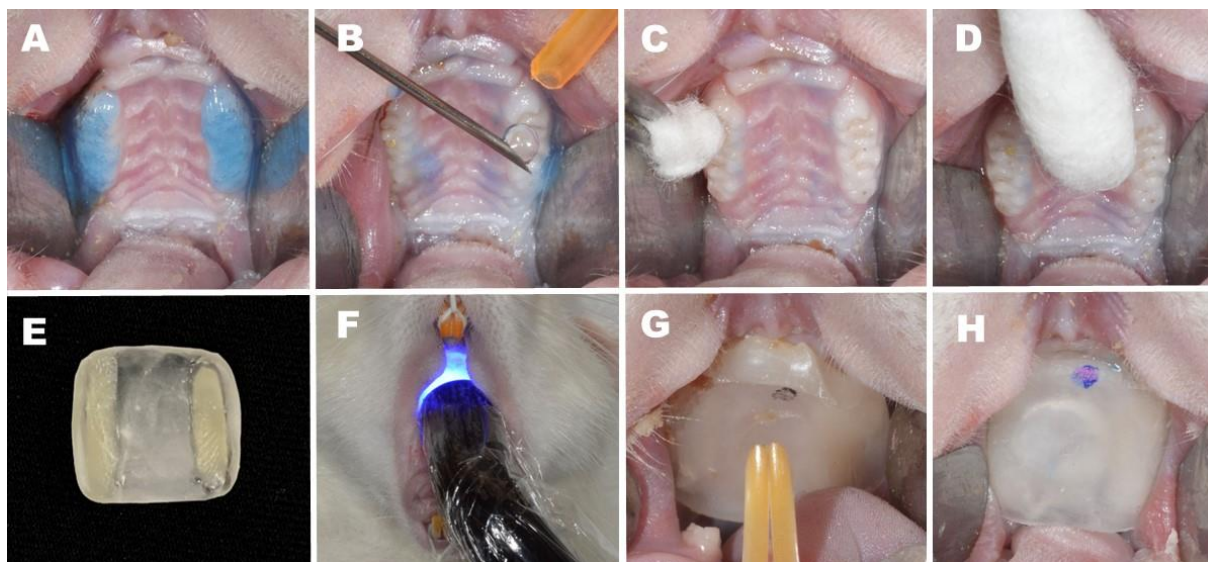
#### 4.6.10 Cimentação dos dispositivos palatinos

Para a cimentação dos DP, o primeiro passo foi o condicionamento da superfície dos dentes molares superiores com ácido fosfórico 37% (Condac, FGM Dental Group, Joinville, SC, Brasil) durante 30 s e, com auxílio de uma seringa com ponta com diâmetro de 0,70 mm, os dentes foram enxaguados com água estéril, também por 30 s. Com um sugador endodôntico descartável (SSPlus, Qualybless do Brasil, Maringá, PR, Brasil) os excessos de ácido fosfórico e água foram removidos. Em seguida, a região foi seca com algodão estéril e a microbiota original do animal coletada com *swab* estéril (Neolab Produtos para Laboratório e Odontologia, São José dos Pinhais, PR, Brasil) embebido em PBS.

A seguir, as próteses com biofilme de *C. albicans* foram cimentadas com cimento resinoso autoadesivo RelyX U200 (3M ESPE, Maplewood, MN, EUA), que foi proporcionado e manipulado de acordo com a recomendação do fabricante, carregado

na região aliviada do dispositivo e fotopolimerizado por 1 min (Bluphase, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein) como mostra a Figura 20.

Figura 20 – Sequência da cimentação dos dispositivos palatinos



Legenda: A) Condicionamento ácido dos molares com ácido fosfórico 37%; B) Enxague com água destilada; C) Secagem com algodão; D) Coleta da microbiota inicial do palato; E) DP carregado com cimento resinoso; F) Fotopolimerização; G) Dispositivo após fotopolimerização sem manta de NF; H) Dispositivo após fotopolimerização com manta de NF.

Fonte: Elaborado pela autora

Após a cimentação, os dispositivos contaminados foram mantidos na cavidade bucal dos animais por um período de 48 h, permitindo o contato direto do biofilme com o palato e a subsequente indução da infecção. Após esse intervalo, os dispositivos foram removidos e substituídos por outros livres de contaminação, que foram cimentados em cada grupo de acordo com seu respectivo tratamento, permanecendo novamente por 48 h.

Antes da recuperação da anestesia, as unhas dos animais foram cortadas com uma tesoura tipo íris (Golgran Millenium, São Caetano do Sul, SP, Brasil) a fim de evitar que se machucassem ao tentar remover os dispositivos (Hotta, 2013).

#### **4.6.11 Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos animais**

Ao final do período de tratamento, os DP foram retirados da cavidade bucal dos animais sedados e colocados em tubos contendo 2 mL de solução salina estéril. Uma amostra do palato dos animais foi coletada por meio de um *swab* estéril, o qual foi esfregado por 30 s no palato, e posteriormente acondicionado em um tubo contendo 1 mL de solução salina estéril.

Os dispositivos e *swabs* coletados foram homogeneizados em vórtex, por cerca de 20 s. Após 100 µL de cada suspensão pura foram semeados em CHROMagar *Candida*, diluições seriadas, juntamente com a pura, pela técnica da gota em ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol. As semeaduras foram incubadas a 37 °C por 48 h, para posterior visualização das colônias e quando possível contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/ mL).

#### **4.6.12 Eutanásia dos animais**

A eutanásia foi realizada ao final do tratamento, administrando-se dose excessiva de anestésico via intraperitoneal com cetamina 10% (100-150 mg/ kg) e xilazina 2% (10-15 mg/ kg), seguida de decapitação. O palato dos animais foi removido com o auxílio de lâminas de bisturi (Solidor Material Médico e Artigos Hospitalares, Maringá, PR, Brasil), cortado em duas porções sagitais e fixado em formalina tamponada a 10%.

#### **4.6.13 Análise histológica**

Para a análise histológica das lesões, a mucosa palatina dos animais foi processada por inclusão em parafina e foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE)

e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

A avaliação dos cortes histológicos foi realizada através de microscópio Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e fotomicrografias foram feitas utilizando o software Axionvision (Versão 4.8, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para a análise de alterações no tecido epitelial.

#### **4.7 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o programa Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, EUA) e foi adotado nível de significância de 5%. O teste *t student* pareado foi usado para o ensaio de esterilidade. A análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para analisar a citotoxicidade e o ensaio de contagem de UFC/ mL. Para o ensaio de liberação da NIS, os valores médios foram contabilizados.

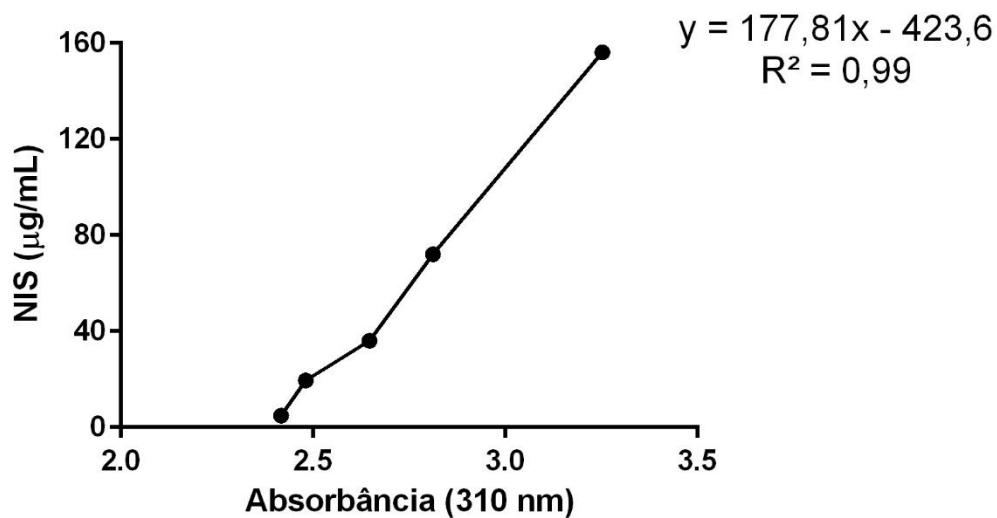
## 5 RESULTADO

### 5.1 Espectroscopia UV-Vis

#### 5.1.1 Curva padrão da nistatina

A curva padrão obtida a partir das diluições de NIS apresentou R<sup>2</sup> de 0,99 (Figura 21).

Figura 21 – Curva padrão de liberação da nistatina



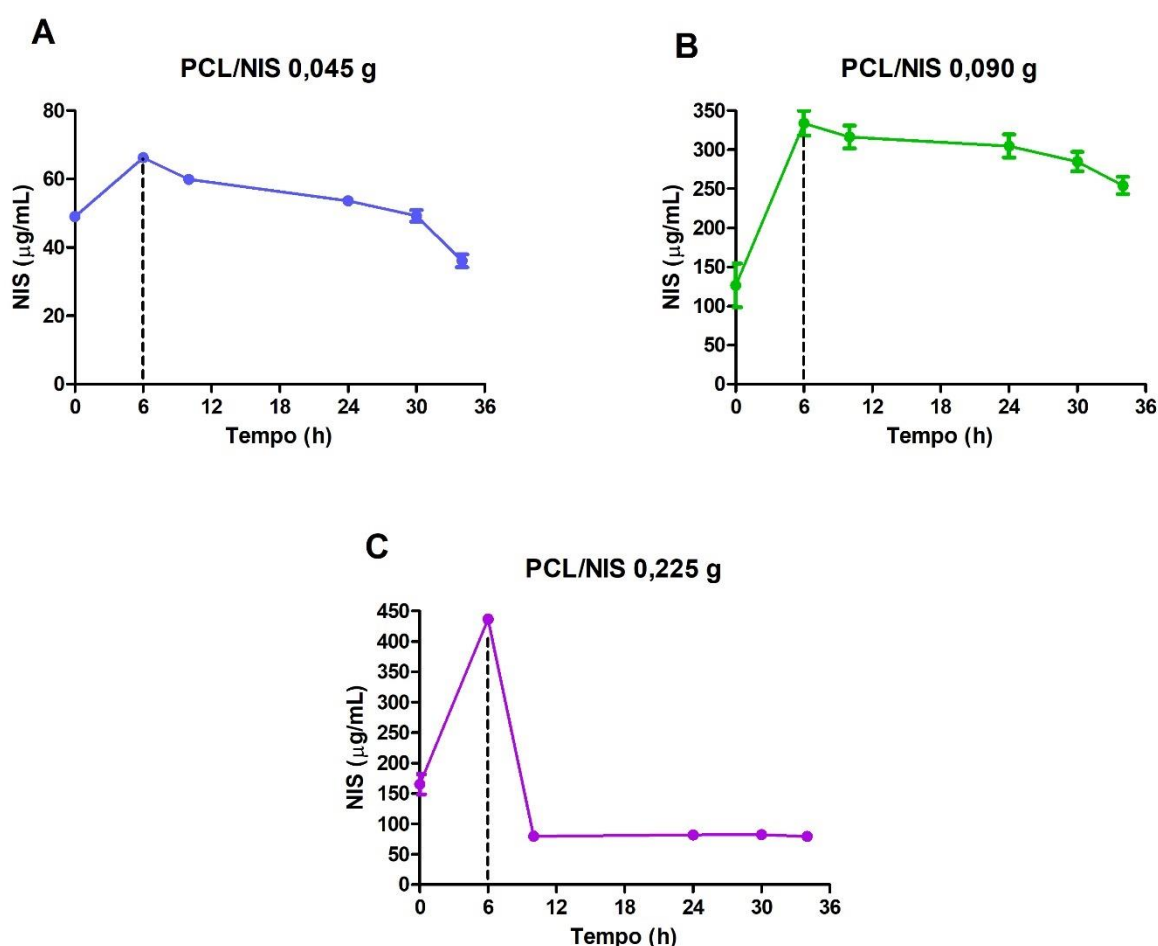
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 5.1.2 Cinética da liberação da nistatina

Todas as amostras de PCL/NIS exibiram um pico de liberação de NIS às 6 h. Neste período, a concentração média de NIS liberada por PCL/NIS 0,045 g foi de

66,26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por sua vez, as mantas de PCL/NIS com 0,090 g e 0,225 g, liberaram 333,87 e 436,51  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NIS, respectivamente. O PCL/NIS 0,045 g apresentou liberação alta e constante em 12, 24, 30 e 34 h. Enquanto para PCL/NIS 0,225 g, a liberação de NIS foi drasticamente reduzida após 6 h, mas permaneceu constante nos momentos subsequentes. Como esperado, não houve liberação de NIS a partir de PCL puro (dados não mostrados). O coeficiente de correlação de 0,9982 e a equação da reta utilizados para a quantificação da concentração de NIS liberada estão demonstrados na Figura 22.

Figura 22 – Liberação de nistatina pelas amostras de PCL/NIS analisadas

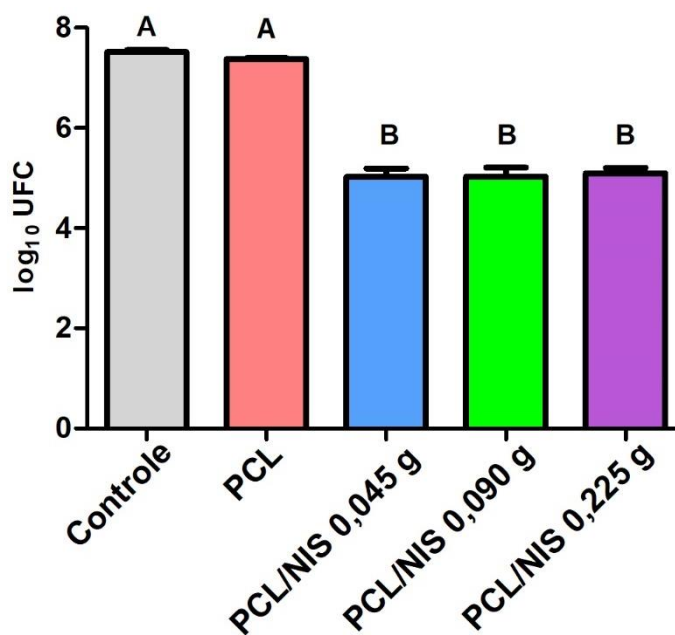


Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.2 Análise das nanofibras em biofilme de *C. albicans*

Na análise da efetividade das mantas de NF em biofilme de *C. albicans*, os grupos com NIS em sua composição, reduziram de 2,5  $\log_{10}$  de crescimento fúngico em relação aos grupos sem tratamento, Controle e PCL ( $p < 0,001$ ). Entre os grupos com tratamento não houve diferença estatística significativa (Figura 23).

Figura 23 – Contagem de UFC/ mL de *C. albicans* em biofilmes não tratados e tratados com PCL/NIS



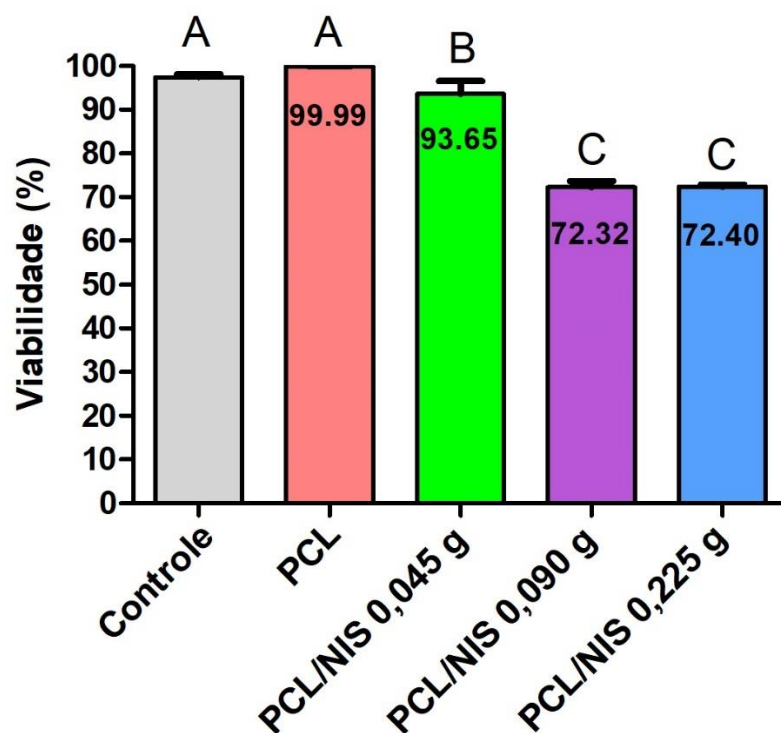
Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.3 Análise da viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat)

A análise em espectrofotômetro mostrou que as células HaCat em contato inicial (24 h) com a NF do grupo PCL/NIS 0,045 g promoveram uma porcentagem de viabilidade celular de 93,7%; enquanto PCL/NIS 0,090 g e PCL/NIS 225 g apresentaram 72,6% e 72,4% de viabilidade celular, respectivamente, e foram

estatisticamente semelhantes entre si. O PCL apresentou uma viabilidade celular de 99,9% e foi estatisticamente diferente dos outros grupos (Figura 24).

Figura 24 – Análise da viabilidade celular em queratinócitos humanos

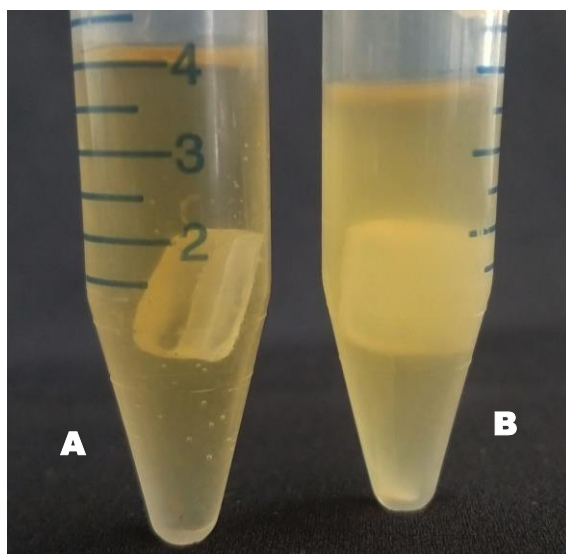


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 5.4 Análise da esterilidade dos dispositivos palatinos

Analisando-se os tubos Falcon contendo os dispositivos, visualmente observou-se turbidez nos meios de cultura do grupo CN quando comparados aos do grupo UV, indicando crescimento microbiano (Figura 25).

Figura 25 – Tubos contendo dispositivos palatinos em meio de cultura



Legenda: A) DP submetido ao procedimento de esterilização em meio de cultura livre de turbidez;  
B) DP não estéril apresentando meio de cultura turvo.  
Fonte: Elaborado pela autora.

Os poços da microplaca de 96 poços para análise de viabilidade microbiana dos dispositivos estéreis e não estéreis estão demonstrados na Figura 26.

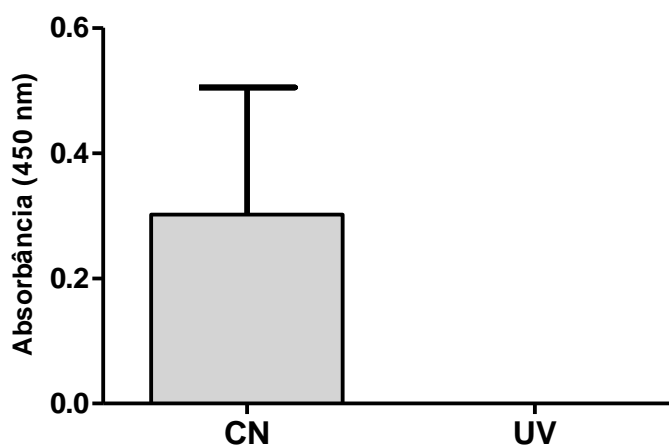
Figura 26 – Análise da esterilidade dos dispositivos em espectrofotômetro



Legenda: Poços de microplaca: A) Grupo UV, DP estéreis, sem a presença de corante para verificação da viabilidade microbiana; B) Grupo CN, DP não estéreis, com a presença de corante para verificação da viabilidade microbiana.  
Fonte: Elaborado pela autora.

O grupo UV teve os DP esterilizados para uso em modelo animal, sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0851$ ) em relação ao CN (Figura 27).

Figura 27 – Médias e desvio padrão da análise da absorbância dos caldos com a presença do corante TTC



Legenda: Grupo CN (controle negativo, não estéril); Grupo UV (estéreis em luz ultravioleta). *Teste t student*,  $p \leq 0,05$ .

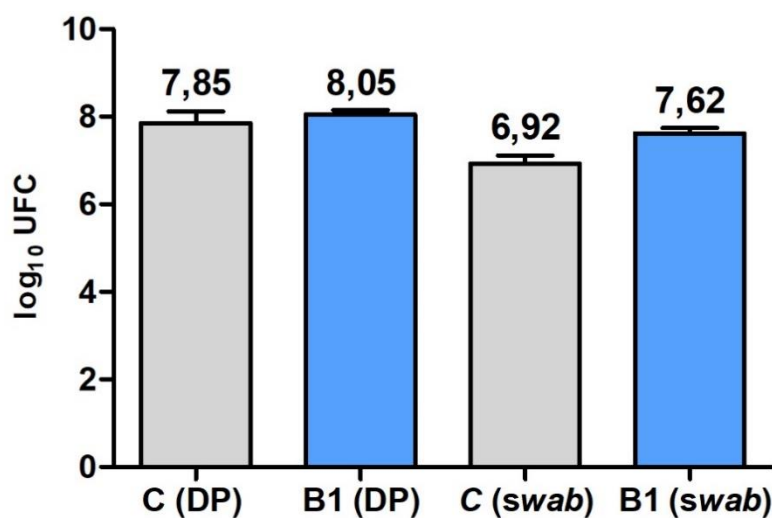
Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.5 Contagem de UFC/ mL

Na verificação prévia ao experimento da colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal, nenhum animal apresentou o crescimento de UFC/ mL em ágar cromogênico.

Após o ensaio, foi possível a recuperação de células de *C. albicans* do palato de todos os ratos dos grupos C e B1. Não houve perda de nenhum animal durante o processo. A contagem de UFC/ mL foi de  $7,85 \log_{10}$  para as amostras com DP e  $6,92 \log_{10}$  para as amostras do *swab* do grupo C, respectivamente. Em relação ao grupo tratado com B1, a contagem de UFC/ mL foi de  $8,05 \log_{10}$  para a coleta do DP e  $7,62 \log_{10}$  para o *swab* (Figura 28).

Figura 28 – Médias e desvio padrão da contagem de UFC/ mL de *C. albicans* das amostras recuperadas do palato dos ratos dos DP dos grupos C e B1



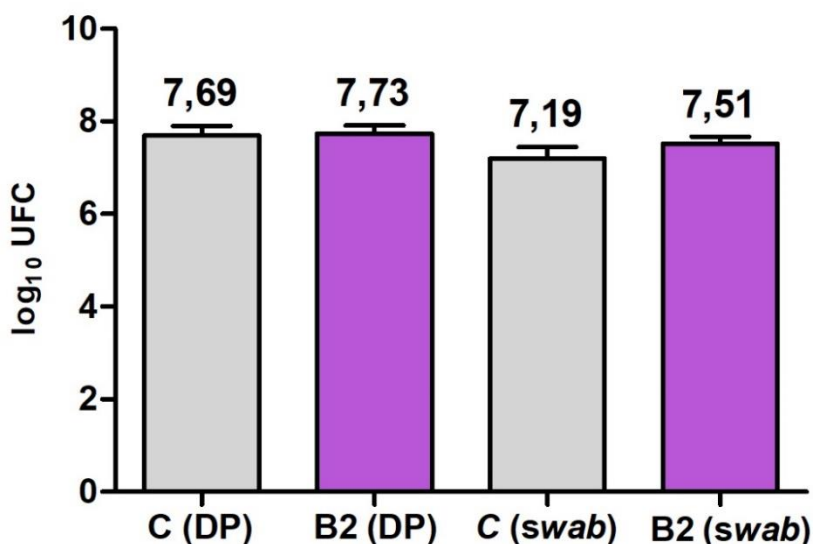
Legenda: C (DP): amostras de DP coletadas de ratos do grupo C; B1 (DP): amostras de DP coletadas de ratos do grupo B1; C (swab): amostra de swab coletada dos ratos do grupo C; B1 (swab): amostras coletadas com swab nos ratos do grupo B1 (ANOVA, teste Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora.

Na verificação prévia ao experimento da colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal do grupo B2, nenhum animal apresentou o crescimento de UFC/ mL em ágar cromogênico. Um animal foi a óbito após o reforço da medicação anestésica, restando cinco ratos para o experimento.

A contagem de UFC/ mL foi de 7,69 log<sub>10</sub> para as amostras do DP e 7,19 log<sub>10</sub> para as amostras do swab do grupo C. Em relação ao grupo com tratamento B2, a contagem de UFC/ mL foi de 7,73 log<sub>10</sub> para a coleta do DP e 7,51 log<sub>10</sub> para o swab (Figura 29).

Figura 29 – Médias e desvio padrão da contagem de UFC/ mL de *C. albicans* das amostras recuperadas do palato dos ratos do grupo C e B2



Legenda: C (DP): amostras de DP coletadas de ratos do grupo C; B2 (DP): amostras de DP coletadas de ratos do grupo B2; C (swab): amostra de swab coletada dos ratos do grupo C; B2 (swab): amostras coletadas com swab nos ratos do grupo B2 (ANOVA, teste Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

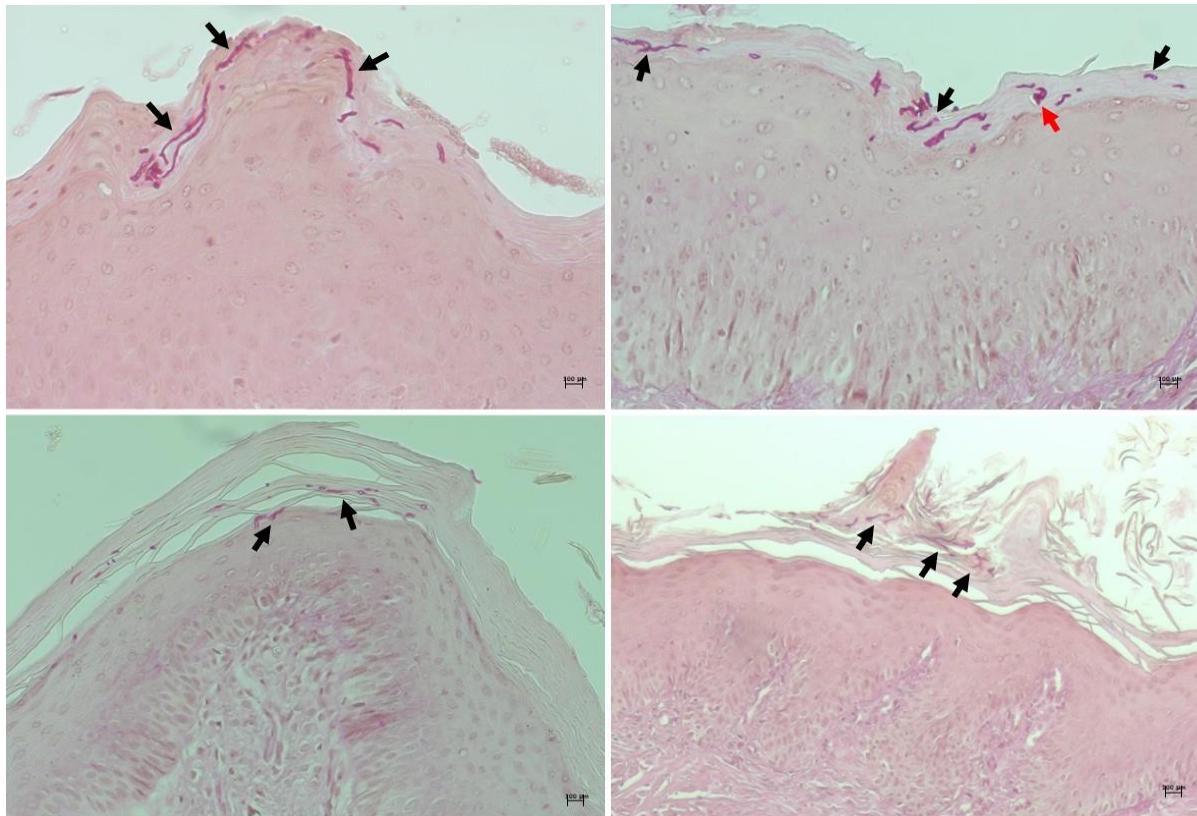
Fonte: Elaborado pela autora.

Os tratamentos aplicados não reduziram a contagem de UFC/ mL de *C. albicans*, sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado.

## 5.6 Análise histológica

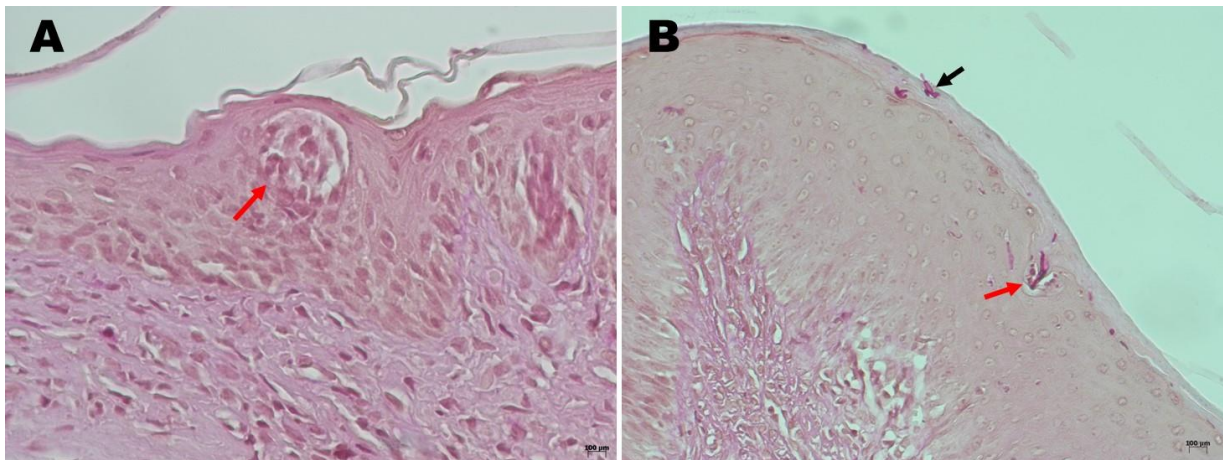
Durante a análise histológica do grupo C, não tratado, pode-se observar a infiltração de pseudohifas e hifas de *Candida* na camada queratinizada da mucosa palatina dos ratos, além da presença de células inflamatórias formando micro abscessos e um discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio infectado. Esses achados confirmam a indução do modelo de EP e estão apresentadas nas Figuras de 30 a 32.

Figura 30 – Lâminas histológicas do grupo C demonstrando infiltração de hifas na camada queratinizada



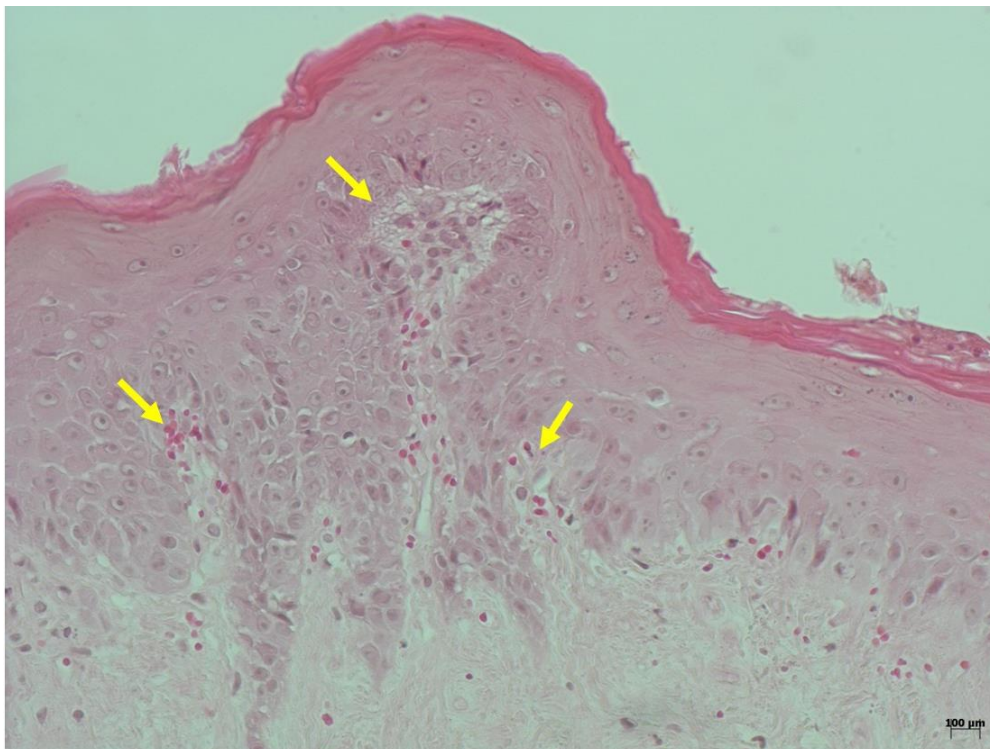
Legenda: Fotomicrografias de corte histológico sagital do palato na área entre os primeiros molares corado por PAS. As setas pretas indicam a presença de hifas, enquanto a seta vermelha indica um micro abscesso no epitélío. Aumento 10x.  
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 31 – Lâminas histológicas do grupo C demonstrando micro abscessos



Legenda: Fotomicrografias de corte histológico sagital do palato na área entre os primeiros molares. As setas vermelhas indicam micro abscessos no epitélio; seta preta indica a presença de hifas. A) Lâmina corada com a técnica HE; B) Lâmina corada com técnica PAS. Aumento 20x  
Fonte: Elaborado pela autora.

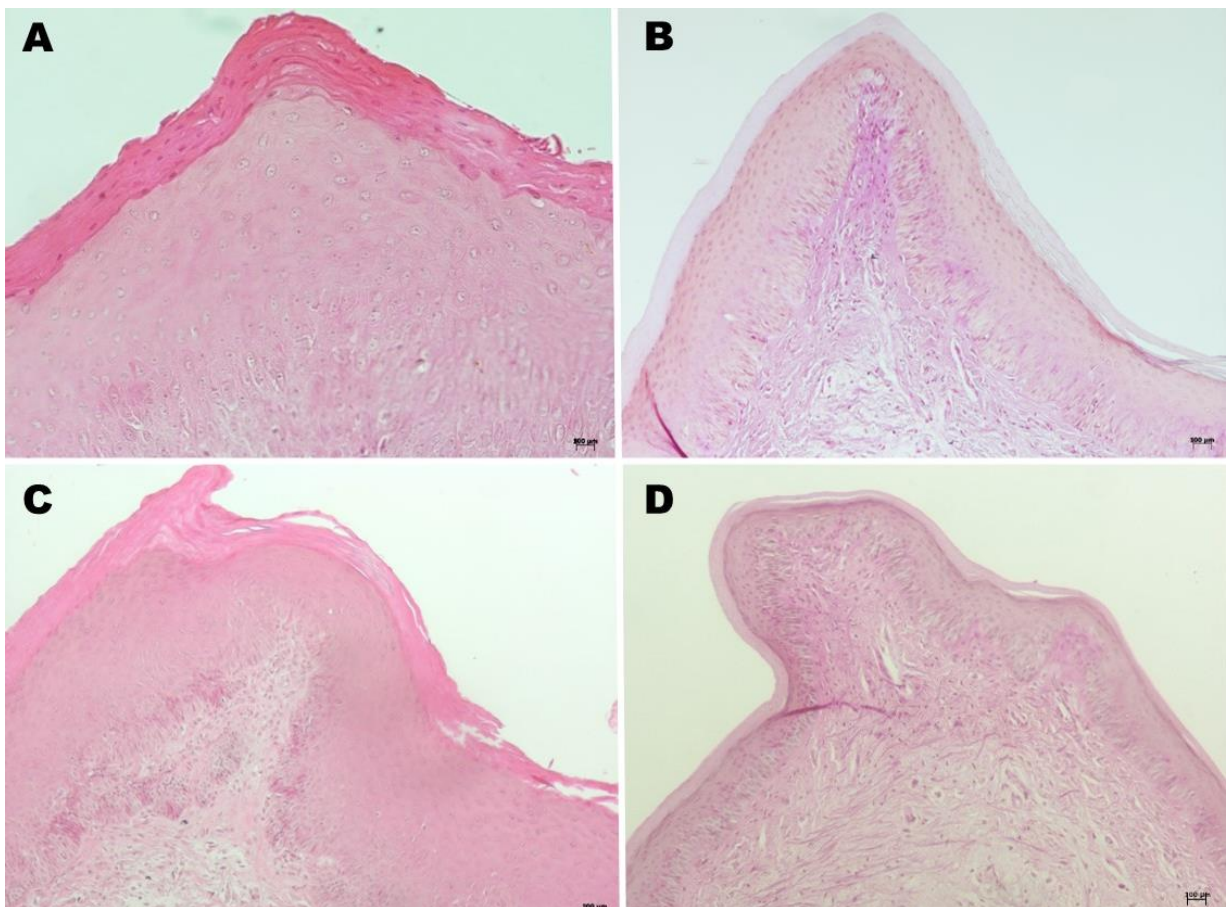
Figura 32 – Lâmina histológica do grupo C demonstrando a presença de um discreto infiltrado inflamatório



Legenda: Fotomicrografias de corte histológico sagital do palato na área entre os primeiros molares corada por HE. As setas amarelas indicam infiltrado inflamatório. Aumento 20x  
Fonte: Elaborado pela autora.

Na análise das lâminas histológicas dos grupos com tratamento B1 e B2, não foram detectadas alterações epiteliais, tanto nas colorações de HE quanto em PAS, como mostra a Figura 33.

Figura 33 – Lâminas histológicas sem alterações epiteliais



Legenda: Fotomicrografias de corte histológico sagital do palato na área entre os primeiros molares. Tecidos com aspecto de normalidade. A) Grupo B1 com coloração HE; B) Grupo B1 com coloração PAS; C) Grupo B2 com coloração HE; D) Grupo B2 com coloração PAS. Aumento 20x.  
Fonte: Elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos com baixa solubilidade em água é desafiador, especialmente ao serem administrados a populações específicas, como os idosos. Além de barreiras tecnológicas, a necessidade de aceitação da forma final do medicamento por esses pacientes complica ainda mais o processo. O uso da nanotecnologia para aprimorar a dissolução e solubilidade dos medicamentos, sem afetar suas propriedades químicas, mostra-se benéfica, o que torna as NF uma solução promissora para alcançar esses objetivos (Potrč et al., 2015).

A escolha do tipo de polímero e o método de adição do medicamento (misturado à matriz polimérica ou aderido à sua superfície), são passos importantes para a liberação controlada de medicamentos através de NF eletrofiadas (Huang et al., 2003). A PCL é um polímero frequentemente utilizado para criar o núcleo hidrofóbico de NF poliméricas, que são principalmente usadas para transportar e liberar medicamentos que não se dissolvem facilmente em água (Veras et al., 2016; Zhang et al., 2010).

Seguindo os parâmetros de de eletrofiação de Santos (2020), neste trabalho foram reproduzidas soluções de PCL com três diferentes concentrações de NIS, obtendo-se quatro mantas de NF (PCL puro, PCL/NIS 0,045 g, PCL/NIS 0,090 g e PCL/NIS 0,225 g). As mantas foram previamente analisadas quanto a sua morfologia e características físico-químicas, demonstrando que sua estrutura não foi modificada após o processo de eletrofiação. Este estudo teve como finalidade a aplicação das mantas, avaliando tanto sua atividade em biofilme *in vitro*, quanto sua segurança e efeito em modelos de EP induzido em animais.

O tratamento de uma patologia requer uma curva adequada de liberação do fármaco a partir da estrutura polimérica. Para isso, a análise da liberação de NIS das NF foi realizada por meio de espectroscopia UV-Vis. A NIS é caracterizada por sua forma de pó higroscópico, fino e amarelo, contendo moléculas orgânicas anfífilas (hidrofílicas e hidrofóbicas) cíclicas denominadas macrolídeos. Sua estrutura inclui uma cadeia lipofílica extensa, tornando-a praticamente insolúvel em água, mas com uma afinidade superior por substâncias lipídicas (ANVISA, 2019; Campoy, Adrio,

2017; Ortiz, Sansinenea 2019; Vandeputte 2012). No entanto, a NIS se dissolve facilmente em DMF, um solvente orgânico utilizado neste trabalho (Yu et al., 2018).

A curva padrão obtida a partir das diluições de NIS apresentou  $R^2$  de 0,99 e na análise da cinética de liberação nas diferentes mantas de PCL/NIS, observou-se um pico uniforme em todas as concentrações às 6 h, proporcional a quantidade de fármaco disponível na NF. PCL/NIS 0,045 g teve uma concentração média de 66,26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , enquanto PCL/NIS com 0,090 g e 0,225 g, foram liberados 333,87 e 436,51  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NIS, respectivamente. O PCL/NIS 0,045 g e PCL/NIS 0,090 g apresentaram liberação alta e constante até 34 h, ao contrário da amostra PCL/NIS 0,225 g, que teve a liberação de NIS drasticamente reduzida após 6 h, mas permaneceu constante nos períodos seguintes. Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura que relatam uma liberação inicialmente mais rápida do fármaco incorporado nas primeiras horas, seguida por uma segunda fase de liberação lenta (Kenawy et al., 2009; Potrč et al., 2015; Tonglairoum et al., 2015).

Por décadas, a administração bucal de medicamentos tem sido a via mais comum. Este ambiente é mais estável para a absorção do medicamento, evitando as condições adversas do sistema gastrointestinal e contornando o efeito hepático de primeira passagem. Apesar da menor permeabilidade da mucosa bucal em comparação com a intestinal, o suprimento sanguíneo abundante permite uma absorção eficaz (Hearnden et al., 2012; Shakya et al., 2011).

Formulações administradas pela mucosa oral são amplamente aceitas devido à sua aplicação simples e não invasiva, especialmente por pacientes geriátricos, que podem ter dificuldades de deglutição ou digestão. No entanto, é primordial que os medicamentos não causem irritação local na mucosa oral (Lam et al., 2014). Por isso, a principal exigência para o uso de um biomaterial é a sua biocompatibilidade, garantindo a prevenção de potenciais reações inflamatórias, rejeição pelo hospedeiro e citotoxicidade (Fernandes et al., 2022). Neste estudo, o ensaio da redução de resazurina foi utilizado para determinar o efeito das três mantas de PCL/NIS na atividade metabólica de queratinócitos humanos. Como resultado, nenhum dos grupos apresentou efeitos citotóxicos e, após 24 h de tratamento, a viabilidade celular permaneceu consistentemente acima de 70% em todos os grupos demonstrando a biocompatibilidade.

Esses resultados evidenciam a preservação das características inerentes do material, visto que a PCL é amplamente utilizada em aplicações de liberação controlada de medicamentos devido à sua não toxicidade (Pawar, Srivastava, 2019). Por outro lado, o uso tópico de NIS é amplamente empregado no tratamento de EP, uma vez que a exposição sistêmica é mínima e não há relatos de interações medicamentosas, sendo considerado um medicamento seguro (Lyu et al., 2016; Scheibler et al., 2017).

As três concentrações diferentes de NIS testadas exibiram efeito inibitório no biofilme, contudo, sem apresentar diferença estatística entre elas. Anteriormente, Santos (2020) focou nas análises de CIM e CMM para avaliar as propriedades antifúngicas das mantas de PCL/NIS e demonstrou que as três concentrações exibiram ambos os efeitos contra *C. albicans*. Isso confirma que a atividade do medicamento permaneceu consistente ao longo do processo de síntese da manta. Embora esses testes proporcionem percepções sobre a eficácia do biomaterial em culturas planctônicas, eles não abrangem completamente as complexidades das infecções relacionadas a biofilmes (Nett et al., 2010).

Biofilmes são sistemas biológicos complexos que atuam como mecanismos protetores, sendo mais resistentes a antifúngicos e às defesas do hospedeiro do que células planctônicas, além de apresentarem taxas de recorrência elevadas de EP (Fanning, Mitchell, 2012; Finkel, Mitchell, 2011; Hall-Stoodley et al., 2004). Quando testadas em biofilmes maduros de 24 h, as mantas apresentaram uma redução das UFC/ mL, corroborando com atividade fungistática da NIS, conhecida por seu amplo espectro de ação (Alkhars et al., 2023; Bassi, Kaur, 2015).

Diversos modelos e técnicas de fabricação têm sido propostas na literatura para viabilizar o uso dos DP visando a indução de EP, o que resulta em uma considerável divergência entre as metodologias (Sugio et al., 2020). A abordagem adotada neste estudo foi adaptada de Hotta (2013) e Moraes (2018); entretanto optou-se por moldar um único animal e criar um modelo universal, no qual os DP subsequentes foram confeccionadas, enquanto os originais passaram por moldagens individuais. O peso dos animais foi monitorado semanalmente para identificar possíveis discrepâncias de tamanho.

Para garantir a contaminação exclusiva por *C. albicans*, os DP foram previamente esterilizados. Métodos físicos como a irradiação com energia de micro-

ondas, exposição à luz UV e banho em ultrassom são comumente utilizados, enquanto o uso de estufas ou autoclaves, têm o potencial de causar danos à RAAT, que não suporta altas temperaturas (Chassot et al., 2006; da Costa et al., 2020; Gantait et al., 2016; Muscat et al., 2018). Métodos químicos, como o uso de clorexidina, glutaraldeído, hipoclorito de sódio, iodo, dióxido de cloro ou solução alcoólica também podem ser empregados (Orsi et al., 2011; Valentini-Mioso et al., 2018). O PMMA possui a capacidade de absorção de líquidos, que é facilitada pela energia interna elevada e polaridade dos grupos carboxílicos, e demanda desinfetantes não tóxicos para evitar resíduos no ambiente bucal (Anusavice et al., 2013; Chassot et al., 2006).

Contudo, o hipoclorito de sódio, por ser um agente clareador, pode afetar a estética das próteses a longo prazo. Além disso, o glutaraldeído tem potencial para gerar resíduos tóxicos, influenciando os resultados histopatológicos e microbiológicos da avaliação da mucosa palatina dos animais durante os experimentos de indução de EP (Chassot et al., 2006; Moraes, 2018). Neste estudo, optou-se pela exposição a luz UV, realizada por 15 min em cada lado do DP, e a análise da esterilidade realizada confirmou a ausência de contaminação nos DP após esse processo.

No estudo *in vivo*, empregou-se um modelo de EP em ratos com DP confeccionados com resina acrílica, desempenhando o papel de facilitador da infecção fúngica. Após a indução da EP, a avaliação da longevidade da infecção em modelos com ratos pode ser comprometida pela resposta imunológica eficiente e rápida desses animais a diversas alterações (Verma et al., 2018). Para contornar isso, a administração prévia de antibióticos é recomendada, a fim de reduzir o número de bactérias orais concorrentes, além das provenientes da coprofagia. Essa abordagem propicia um aumento significativo no crescimento de leveduras, resultando em uma infecção fúngica evidente (Nett et al., 2010; Wong et al., 2014; Samaranayake, Samaranayake, 2001; Yano et al., 2016). Além disso, antibióticos como a tetraciclina, frequentemente associada ao desenvolvimento de EP em humanos, também se mostraram eficazes em induzir lesões mais precoces e intensas em ratos (Samaranayake, Samaranayake, 2001; Tobouti et al., 2015).

O modelo de indução da EP foi viabilizado, optando-se por um período de infecção curto, de 48 h. Precauções foram tomadas para evitar o descolamento da prótese, incluindo uma dieta pastosa fornecida aos animais e o corte das unhas (Hotta, 2013; Sugio et al., 2020). Ao final desse período, não foram observadas alterações na

análise clínica dos palatos dos animais. Segundo Jones e Adams (1970), a ausência de sinais clínicos em ratos com lesões de EP pode ser atribuída ao fato de que, embora essas lesões se assemelhem histologicamente, são clinicamente menos visíveis em comparação com as encontradas em seres humanos.

A recuperação do crescimento fúngico nos palatos foi observada até cinco dias após o início da indução da EP, conforme evidenciado pela contagem de células viáveis de *C. albicans*. Mesmo não tendo ocorrido uma redução significativa na contagem de UFC/ mL entre os grupos que receberam ou não tratamento, a análise histológica revelou que os grupos tratados (B1 e B2) apresentaram ausência de alterações epiteliais e hifas, ao contrário dos grupos que não tratados (C). As alterações epiteliais encontradas corroboram com achados na literatura (Garcia et al., 2024; Neville et al., 2016; Sultan et al., 2019).

Esses resultados indicam a eficácia da manta de NF na inibição da penetração de hifas no tecido, e também apontam para a necessidade de uma avaliação mais aprofundada do impacto da NIS na redução da contagem de UFC/ mL, considerando o potencial efeito da resistência natural dos animais (Junqueira et al., 2009; Conti et al., 2014). Dessa forma, a manta de NF destaca-se como uma promissora estratégia de prevenção da invasão fúngica na EP, mesmo diante do desafio encontrado na contagem de UFC.

A elaboração e a utilização de modelos animais são fundamentais para a avaliação de novas alternativas terapêuticas para a EP. No entanto, isso não é uma tarefa simples, uma vez que ainda existem muitas questões sem respostas e desafios a serem superados para aprimorar a eficácia terapêutica (Moraes et al., 2022). Em suma, os resultados *in vivo* sugerem que as diferentes concentrações de NF/PCL representam alternativas seguras, entretanto, devido à complexidade do estudo com modelos animais, são necessários estudos mais detalhados para a otimização da liberação controlada e eficácia terapêutica.

## 7 CONCLUSÃO

Todas as concentrações das mantas estudadas apresentaram cinética de liberação de NIS, com concentração máxima de 6 h, sendo capazes de inibir a formação de biofilme maduro, sem apresentar citotoxicidade. Nos modelos animais, foi possível induzir a infecção por *C. albicans*, com presença de alterações epiteliais e hifas na análise histológica. Os tratamentos aplicados com NIS não promoveram redução significativa na contagem de UFC/ mL, porém, foram eficazes na inibição da penetração de hifas do palato dos animais.

## REFERÊNCIAS

Abuhajar E, Ali K, Zulfiqar G, Al Ansari K, Raja HZ, Bishti S, Anweigi L. Management of Chronic Atrophic Candidiasis (Denture Stomatitis)-A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Feb 9;20(4):3029. doi: 10.3390/ijerph20043029. PubMed PMID: 36833718.

Adam RZ, Khan SB. Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Candida albicans*. *Materials (Basel)*. 2022 Aug 18;15(16):5666. doi: 10.3390/ma15165666. PubMed PMID: 36013803.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Farmacopéia Brasileira: Volume II – Monografias Insumos Farmacêuticos e Especialidade. Brasília: ANVISA: 2019.

Ahmed FE, Lalia BS, Hashaike R. A review on electrospinning for membrane fabrication: challenges and applications. *Desalination*. 2015;356:15-30. doi: 10.1016/j.desal.2014.09.033.

Alcazar-Fuoli L, Buitrago M, Gomez-Lopez A, Mellado E. An alternative host model of a mixed fungal infection by azole susceptible and resistant *Aspergillus* spp strains. *Virulence*. 2015;6(4):376-84. doi: 10.1080/21505594.2015.1025192. PubMed PMID: 26065322.

Alkhars N, Gaca A, Zeng Y, Al-Jallad N, Rustchenko E, Wu TT, Eliav E, Xiao J. Antifungal Susceptibility of Oral *Candida* Isolates from Mother-Infant Dyads to Nystatin, Fluconazole, and Caspofungin. *J Fungi (Basel)*. 2023 May 17;9(5):580. doi: 10.3390/jof9050580. PubMed PMID: 37233291.

Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015 Jun;13(6):787-98. doi: 10.1586/14787210.2015.1032939. Epub 2015 Apr 5. PubMed PMID: 25843556.

Altinci P, Mutluay M, Söderling E, Tezvergil-Mutluay A. Antimicrobial efficacy and mechanical properties of BAC-modified hard and soft denture liners. *Odontology*. 2018 Jan;106(1):83-89. doi: 10.1007/s10266-017-0303-8. Epub 2017 Mar 20. PubMed PMID: 28321584.

Alves F, Carmello JC, Alonso GC, Mima EGO, Bagnato VS, Pavarina AC. A randomized clinical trial evaluating Photodithazine-mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy as a treatment for Denture stomatitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Dec;32:102041. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102041. Epub 2020 Oct 3. PubMed PMID: 33022417.

Alzayer YM, Gomez GF, Eckert GJ, Levon JA, Gregory RL. The Impact of Nicotine and Cigarette Smoke Condensate on Metabolic Activity and Biofilm Formation of *Candida albicans* on Acrylic Denture Material. *J Prosthodont*. 2020 Feb;29(2):173-178. doi: 10.1111/jopr.12945. Epub 2018 Jul 20. PubMed PMID: 30028051.

An JY, Darveau R, Kaeberlein M. Oral health in geroscience: animal models and the aging oral cavity. *Geroscience*. 2018 Feb;40(1):1-10. doi: 10.1007/s11357-017-00049. Epub 2017 Dec 27. PubMed PMID: 29282653.

Andersen ML, Winter LMF. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *An Acad Bras Cienc*. 2019;91(suppl 1):e20170238. doi: 10.1590/0001-3765201720170238. Epub 2017 Sep 4. PubMed PMID: 28876358.

Anup N, Chavan T, Chavan S, Polaka S, Kalyane D, Abed SN, Venugopala KN, Kalia K, Tekade RK. Reinforced electrospun nanofiber composites for drug delivery applications. *J Biomed Mater Res A*. 2021 Oct;109(10):2036-2064. doi: 10.1002/jbm.a.37187. Epub 2021 Apr 9. PubMed PMID: 33834610.

Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. *Phillips Materiais Dentários*. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

Anuta V, Talianu MT, Dinu-Pîrvu CE, Ghica MV, Prisada RM, Albu Kaya MG, Popa L. Molecular Mapping of Antifungal Mechanisms Accessing Biomaterials and New Agents to Target Oral Candidiasis. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 7;23(14):7520. doi: 10.3390/ijms23147520. PubMed PMID: 35886869.

Arastehfar A, Gabaldón T, Garcia-Rubio R, Jenks JD, Hoenigl M, Salzer HJF, et al. Drug-Resistant Fungi: An Emerging Challenge Threatening Our Limited Antifungal Armamentarium. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Dec 8;9(12):877. doi: 10.3390/antibiotics9120877. PubMed PMID: 33302565.

Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Apr 1;10 Suppl1:E27-39. English, Spanish. PubMed PMID: 15800465.

Bail M, Meister LM, Campagnoli EB, Jorge JH, Ban Mde C, Sanchez-Ayala A, Campanha NH. Histopathological changes by the use of soft relined materials: a rat model study. *PLoS One*. 2014 Jun 25;9(6):e100293. doi: 10.1371/journal.pone.0100293. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(8):e106701. PubMed PMID: 24963657.

Bajunaid SO, Baras BH, Weir MD, Xu HHK. Denture Acrylic Resin Material with Antibacterial and Protein-Repelling Properties for the Prevention of Denture Stomatitis. *Polymers (Basel)*. 2022 Jan 7;14(2):230. doi: 10.3390/polym14020230. PubMed PMID: 35054637.

Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, Rompré P, Deslauriers N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95(1):51-9. doi: 10.1067/moe.2003.44. PubMed PMID: 12539027.

Bassi P, Kaur G. Bioadhesive vaginal drug delivery of nystatin using a derivatized polymer: Development and characterization. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015 Oct;96:173-84. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.07.018. Epub 2015 Jul 30. PubMed PMID: 26235393.

Baxter VK and Griffin DE. Animal models: No model is perfect, but many are useful. *Viral pathogenesis*. 3rd ed. Boston:Academic Press. 2016.125–138 p.

Berman J, Krysan DJ. Drug resistance and tolerance in fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2020 Jun;18(6):319-331. doi: 10.1038/s41579-019-0322-2. Epub 2020 Feb 11. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*. 2020 Jun 29; PubMed PMID: 32047294.

Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*. 2010 May-Jun;28(3):325-47. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004. Epub 2010 Jan 25. PubMed PMID: 20100560.

Bhatt P, Trehan S, Inamdar N, Mourya VK, Misra A. *Applications of Polymers in Drug Delivery*. 2nd ed. Oxford: Elsevier: 2021. ISBN 9780128196595.

Borandeh S, van Bochove B, Teotia A, Seppälä J. Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021 Jun;173:349-373. doi: 10.1016/j.addr.2021.03.022. Epub 2021 Apr 6. PubMed PMID: 33831477.

Borg-Bartolo R, Rocuzzo A, Molinero-Mourelle P, Schimmel M, Gambetta-Tessini K, Chaurasia A, et al. Global prevalence of edentulism and dental caries in middle-aged and elderly persons: A systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2022 Dec;127:104335. doi: 10.1016/j.jdent.2022.104335. Epub 2022 Oct 17. PubMed PMID: 36265526.

Boros-Majewska J, Salewska N, Borowski E, Milewski S, Malic S, Wei XQ, Hayes AJ, Wilson MJ, Williams DW. Novel Nystatin A<sub>1</sub> derivatives exhibiting low host cell toxicity and antifungal activity in an *in vitro* model of oral candidosis. *Med Microbiol Immunol*. 2014 Oct;203(5):341-55. doi: 10.1007/s00430-014-0343-4. Epub 2014 Jun 13. PubMed PMID: 24924305.

- Brantes MF, Azevedo RS, Rozza-de-Menezes RE, Póvoa HC, Tucci R, Gouvêa AF, Takahama-Jr A. Analysis of risk factors for maxillary denture-related oral mucosal lesions: A cross-sectional study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019 May 1;24(3):e305-e313. doi: 10.4317/medoral.22826. PubMed PMID: 31011141.
- Brunke S, Quintin J, Kasper L, Jacobsen ID, Richter ME, Hiller E, Schwarzmüller T, d'Enfert C, Kuchler K, Rupp S, Hube B, Ferrandon D. Of mice, flies--and men? Comparing fungal infection models for large-scale screening efforts. *Dis Model Mech*. 2015 May;8(5):473-86. doi: 10.1242/dmm.019901. Epub 2015 Mar 18. PubMed PMID: 25786415.
- Budtz-Jorgensen E. Denture stomatitis. IV. An experimental model in monkeys. *Acta Odontol Scand*. 1971 Nov;29(5):513-26. doi: 10.3109/00016357109026330. PubMed PMID: 5003661.
- Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol Scand*. 1970 Mar;28(1):71-92. doi: 10.3109/00016357009033133. PubMed PMID: 4909071.
- Bueno MG, Sousa EJB, Hotta J, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Surface Properties of Temporary Soft Liners Modified by Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungals. *Braz Dent J*. 2017 Jan-Apr;28(2):158-164. doi: 10.1590/0103-6440201701266. PubMed PMID: 28492744.
- Cahn LR. The denture sore mouth. *Annals of Dentistry*. 1936; 3, 33.
- Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol*. 2017 Jun 1;133:86-96. doi: 10.1016/j.bcp.2016.11.019. Epub 2016 Nov 21. PubMed PMID: 27884742.
- Cannon RD. Oral Fungal Infections: Past, Present, and Future. *Front Oral Health*. 2022 Feb 3;3:838639. doi: 10.3389/froh.2022.838639. PubMed PMID: 35187534.
- Capilla J, Clemons KV, Stevens DA. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol*. 2007 Dec;45(8):657-84. doi: 10.1080/13693780701644140. PubMed PMID: 18027253.
- Cawson RA. Symposium on denture sore mouth. II. The role of *Candida*. *The Dental practitioner and dental record*. 1965 Dec;16(4):138-42.
- Černáková L, Rodrigues CF. Microbial interactions and immunity response in oral *Candida* species. *Future Microbiol*. 2020 Nov;15:1653-1677. doi: 10.2217/fmb-2020-0113. Epub 2020 Nov 30. PubMed PMID: 33251818.
- Chandra R, Rustgi R. Biodegradable Polymers. *Prog Polym Sci*. 1998;23(7):1273-335. doi: 10.1016/S0079-6700(97)00039-7.

Chaparro FJ, Presley KF, Coutinho da Silva MA, Lannutti JJ. Sintered electrospun polycaprolactone for controlled model drug delivery. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Jun;99:112-120. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.095. Epub 2019 Jan 25. PubMed PMID: 30889645.

Chassot AL, Poisl MI, Samuel SM. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Braz Dent J.* 2006;17(2):117-21. doi: 10.1590/s0103-64402006000200006. PubMed PMID: 16924337.

Chen X, Wei S, Gunesoglu C, Zhu J, Southworth CS, Sun L, et al. Electrospun magnetic fibrillar polystyrene nanocomposites reinforced with nickel nanoparticles. *Macromol Chem Phys.* 2010; 211:1775-83. doi: 10.1002/macp.201000153.

Cheng ML, Lin CC, Su HL, Chen PY, Sun YM. Processing and characterization of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanofibrous membranes. *Polymer.* 2008;49(2):546-53. doi: 10.1016/j.polymer.2007.11.049.

Choi YH, Lee U, Lee BK, Lee MG. Pharmacokinetic interaction between itraconazole and metformin in rats: competitive inhibition of metabolism of each drug by each other via hepatic and intestinal CYP3A1/2. *Br J Pharmacol.* 2010 Oct;161(4):815-29. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00913.x. PubMed PMID: 20860661.

Chopde N, Jawale B, Pharande A, Chaudhari L, Hiremath V, Redasani R. Microbial colonization and their relation with potential cofactors in patients with denture stomatitis. *J Contemp Dent Pract.* 2012 Jul 1;13(4):456-9. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1168. PubMed PMID: 23151692.

Chow CK, Matear DW, Lawrence HP. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. *Gerodontology.* 1999 Dec;16(2):110-8. doi: 10.1111/j.1741-2358.1999.00110.x. PubMed PMID: 10825850.

Cipitria A, Skelton A, Dargaville TR, Dalton PD, Hutmacher DW. Design, fabrication, and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *J Mater Chem.* 2011; 21(26):9419-53. doi: 10.1039/C0JM04502K.

Contaldo M, Di Stasio D, Romano A, Fiori F, Della Vella F, Rupe C, Lajolo C, Petruzzi M, Serpico R, Lucchese A. Oral Candidiasis and Novel Therapeutic Strategies: Antifungals, Phytotherapy, Probiotics, and Photodynamic Therapy. *Curr Drug Deliv.* 2023;20(5):441-456. doi: 10.2174/1567201819666220418104042. PubMed PMID: 35440307.

Conti HR, Huppler AR, Whibley N, Gaffen SL. Animal models for candidiasis. *Curr Protoc Immunol.* 2014 Apr 2;105:19.6.1-19.6.17. doi: 10.1002/0471142735.im1906s105. PubMed PMID: 24700323.

Cooley JF, inventor. Apparatus for electrically dispersing fluids. US Patent Specification 692631. 1902 Feb 4.

Coombes AGA, Rizzi SC, Williamson M, Barralet JE, Downes S, Wallace WA. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*. 2004 Jan;25(2):315-25. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00535-0. PubMed PMID: 14585719.

Corden TJ, Jones IA, Rudda CD, Christian P, Downes S. Initial development into a novel technique for manufacturing a long fibre thermoplastic bioabsorbable composite: in-situ polymerisation of poly- $\epsilon$ -caprolactone. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 1999; 30(6):737-46.

Costa RGF, Oliveira JE, Paula GF, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, et al. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte II: aplicações e perspectivas. *Polímeros*. 2012;22(2):178-85. doi: 10.1590/S0104-14282012005000026.

Cramariuc B, Cramariuc R, Scarlet R, Manea LR, Lupu IG, Cramariuc O. Fiber diameter in electrospinning process. *J Electrostat.* 2013 Jun;71(3):189-198. doi: 10.1016/j.elstat.2012.12.018.

da Costa RMB, Poluha RL, De la Torre Canales G, Junior JFS, Conti PCR, Neppelenbroek KH, et al. The effectiveness of microwave disinfection in treating *Candida*-associated denture stomatitis: a systematic review and metaanalysis. *Clin Oral Investig.* 2020 Nov;24(11):3821-3832. doi: 10.1007/s00784-020-03599-5. Epub 2020 Sep 24. PubMed PMID: 32974776.

Dangi YS, Soni ML, Namdeo KP. Oral candidiasis: a review. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2010; 2(4):36-41.

de Araújo MRC, Maciel PP, Castellano LRC, Bonan PRF, Alves DDN, de Medeiros ACD, de Castro RD. Efficacy of essential oil of cinnamon for the treatment of oral candidiasis: A randomized trial. *Spec Care Dentist.* 2021 May;41(3):349-357. doi: 10.1111/scd.12570. Epub 2021 Jan 21. PubMed PMID: 33475184.

de Azevedo Izidoro AC, Semprebom AM, Baboni FB, Rosa RT, Machado MA, Samaranayake LP, Rosa EA. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. *Arch Oral Biol.* 2012 Feb;57(2):148-53. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.08.016. Epub 2011 Sep 15. PubMed PMID: 21924704.

de Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, Scorzoni L, Fenley JC, Junqueira JC. *Candida* Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. *Mycopathologia.* 2020 Jun;185(3):415-424. doi: 10.1007/s11046-020-00445-w. Epub 2020 Apr 10. PubMed PMID: 32277380.

Demir MM, Yilgor I, Yilgor E, Erman B. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*. 2002 May;43(11):3303-9. doi: 10.1016/S0032-3861(02)00136-2.

Desai JP, Nair RU. Oral Health Factors Related to Rapid Oral Health Deterioration among Older Adults: A Narrative Review. *J Clin Med*. 2023 Apr 29;12(9):3202. doi: 10.3390/jcm12093202. PubMed PMID: 37176641.

de Souza R, Chaves C, Rohani K, Bouferguene S, Barbeau J, Borie E, Weber B, Fuentes R, Crizostomo L, Silva-Lovato C, Emami E. Palatal brushing for the treatment of denture stomatitis: A multicentre randomized controlled trial. *J Prosthodont Res*. 2023 Jan 6;67(1):93-102. doi: 10.2186/jpr.JPR\_D\_21\_00258. Epub 2022 Mar 8. PubMed PMID: 35264510.

de Souza RF, Khiyani MF, Chaves CAL, Feine J, Barbeau J, Fuentes R, Borie E, Crizostomo LC, Silva-Lovato CH, Rompre P, Emami E. Improving practice guidelines for the treatment of denture-related erythematous stomatitis: a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2017 May 5;18(1):211. doi: 10.1186/s13063-017-1947-y. PubMed PMID: 28476133.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent*. 2005 Mar;33(3):223-33. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009. Epub 2004 Dec 19. PubMed PMID: 15725522.

Dorocka-Bobkowska B, Medyński D, Pryliński M. Recent advances in tissue conditioners for prosthetic treatment: A review. *Adv Clin Exp Med*. 2017 Jul;26(4):723-728. doi: 10.17219/acem/62634. PubMed PMID: 28691420.

dos Santos CM, Hilgert JB, Padilha DM, Hugo FN. Denture stomatitis and its risk indicators in south Brazilian older adults. *Gerodontology*. 2010 Jun;27(2):134-40. doi: 10.1111/j.1741-2358.2009.00295.x. Epub 2009 Jun 22. PubMed PMID: 19545319.

Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003 Jan;11(1):30-6. doi: 10.1016/s0966-842x(02)00002-1. PubMed PMID: 12526852.

Duan YY, Jia J, Wang S, Yan W, Jin L, Wang Z. Preparation of Antimicrobial Poly(ε-caprolactone) Electrospun Nanofibers Containing Silver-Loaded Zirconium Phosphate Nanoparticles. *J Appl Polym Sci*. 2007;106:1208–1214. doi: 10.1002/app.26786.

Einhorn OM, Georgiou K, Tompa A. Salivary dysfunction caused by medication usage. *Physiol Int*. 2020 Jul 24;107(2):195-208. doi: 10.1556/2060.2020.00019. PubMed PMID: 32750027.

Emami E, de Souza RF, Kabawat M, Feine JS. The impact of edentulism on oral and general health. *Int J Dent*. 2013;2013:498305. doi: 10.1155/2013/498305. Epub 2013 May 8. PubMed PMID: 23737789.

Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Dent*. 2014 Feb;42(2):99-106. doi: 10.1016/j.jdent.2013.11.021. Epub 2013 Dec 4. PubMed PMID: 24316341.

Engelberg I, Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. *Biomaterials*. 1991 Apr;12(3):292-304. doi: 10.1016/0142-9612(91)90037-b. PubMed PMID: 1649646.

Ercalik-Yalcinkaya S, Özcan M. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. *J Prosthodont*. 2015 Jun;24(4):271-8. doi: 10.1111/jopr.12208. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25231090.

Fadil F, Affandi NDN, Misnon MI, Bonnia NN, Harun AM, Alam MK. Review on Electrospun Nanofiber-Applied Products. *Polymers (Basel)*. 2021 Jun 24;13(13):2087. doi: 10.3390/polym13132087. PubMed PMID: 34202857.

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir. Bras*. 2004 Jan;19 (1):59-65. doi:10.1590/S0102-86502004000100010.

Fang J, Huang B, Ding Z. Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis. *J Prosthet Dent*. 2021 Feb;125(2):257-265. doi: 10.1016/j.prosdent.2019.12.025. Epub 2020 Mar 10. PubMed PMID: 32165010.

Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002585. doi: 10.1371/journal.ppat.1002585. Epub 2012 Apr 5. PubMed PMID: 22496639.

Fernandes MS, Kukulka EC, de Souza JR, Borges ALS, Campos TMB, Thim GP et al. Development and characterization of PCL membranes incorporated with Zn-doped bioactive glass produced by electrospinning for osteogenesis evaluation. *J Polym Res*. 2022; 29:370. doi: 10.1007/s10965-022-03208-x.

Figueiredo-Godoi LMA, Menezes RT, Carvalho JS, Garcia MT, Segundo AG, Jorge AOC, Junqueira JC. Exploring the *Galleria mellonella* model to study antifungal photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Sep;27:66-73. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.010. Epub 2019 May 14. PubMed PMID: 31100446.

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Feb;9(2):109-18. doi: 10.1038/nrmicro2475. Epub 2010 Dec 29. PubMed PMID: 21189476.

Fisker AV, Rindom Schiøtt C, Philipsen HP. Short-term oral candidosis in rats, with special reference to the site of infection. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*. 1982 Feb;90(1):49-57. doi: 10.1111/j.1699-0463.1982.tb00080.x. PubMed PMID: 7080824.

Formhals A, inventor. Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent Specification 1975504A. 1934 Oct.

Formhals A, inventor. Production of artificial fibers from fiber forming liquids. US Patent Specification 1975504A. 1940 Mar.

Frandsen JL, Ghandehari H. Recombinant protein-based polymers for advanced drug delivery. *Chem Soc Rev*. 2012 Apr 7;41(7):2696-706. doi: 10.1039/c2cs15303c. Epub 2012 Feb 17. PubMed PMID: 22344293.

Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira E Ferreira E. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *J Oral Rehabil*. 2008 May;35(5):370-4. doi: 10.1111/j.1365-2842.2007.01782.x. PubMed PMID: 18405273.

Gad MM, Fouda SM. Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatitis treatment. *Dent Med Probl*. 2020 Jan-Mar;57(1):95-102. doi: 10.17219/dmp/112861. PubMed PMID: 32307934.

Gantait S, Bhattacharyya J, Das S, Biswas S, Ghata A, Ghosh S, Goel P. Comparative assessment of the effectiveness of different cleaning methods on the growth of *Candida albicans* over acrylic surface. *Contemp Clin Dent*. 2016 Jul-Sep;7(3):336-42. doi: 10.4103/0976-237X.188554. PubMed PMID: 27630498.

Gao Z, Wang Q, Yao Q, Zhang P. Application of Electrospun Nanofiber Membrane in the Treatment of Diabetic Wounds. *Pharmaceutics*. 2021 Dec 21;14(1):6. doi: 10.3390/pharmaceutics14010006. PubMed PMID: 35056901.

Garcia LT, Jones JD. Soft liners. *Dent Clin North Am*. 2004 Jul;48(3):709-20, vii. doi: 10.1016/j.cden.2004.03.001. PubMed PMID: 15261801.

Garcia MT, Carmo PHF, Figueiredo-Godoi LMA, Gonçalves NI, Lima PMNd, Ramos LP, Oliveira LD, Borges ALS, Shukla A, Junqueira JC. Gellan-Based Hydrogel as a Drug Delivery System for Caffeic Acid Phenethyl Ester in the Treatment of Oral *Candida albicans* Infections. *Pharmaceutics*. 2024 Jan 16, 298. doi: 10.3390/pharmaceutics16030298.

Gautam R, Singh RD, Sharma VP, Siddhartha R, Chand P, Kumar R. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Jul;100(5):1444-50. doi: 10.1002/jbm.b.32673. Epub 2012 Mar 27. PubMed PMID: 22454327.

Geerts GA, Stuhlinger ME, Basson NJ. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. *J Oral Rehabil.* 2008 Sep;35(9):664-9. doi: 10.1111/j.1365-2842.2007.01805.x. PubMed PMID: 18793352.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011 Jun;20(4):251-60. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x. Epub 2011 Apr 4. PubMed PMID: 21463383.

Gheorghe DC, Niculescu AG, Bîrcă AC, Grumezescu AM. Biomaterials for the Prevention of Oral Candidiasis Development. *Pharmaceutics.* 2021 May 27;13(6):803. doi: 10.3390/pharmaceutics13060803. PubMed PMID: 34072188.

Grover C, Dhawan P, Mehta D, Nautiyal M. "Denture Stomatitis – A Review". *J Prosthet Implant Dent.* 2022; 5(2):68-93. doi: 10.55231/jpid.2022.v05.i02.01.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016 May;18(5):310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002. Epub 2016 Jan 22. PubMed PMID: 26806384.

Gunasegar S, Himratul-Aznita WH. Nicotine enhances the thickness of biofilm and adherence of *Candida albicans* ATCC 14053 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019. *FEMS Yeast Res.* 2019 Mar 1;19(2). doi: 10.1093/femsyr/foy123. PubMed PMID: 30476044.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):95-108. doi: 10.1038/nrmicro821. PubMed PMID: 15040259.

Hau J. Animal models for human diseases - Sourcebook of models for biomedical research. Totowa: Humana Press. 2008, 3–8 p.

Hazen EL, Brown R. Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951 Jan;76(1):93-7. doi: 10.3181/00379727-76-18397. PubMed PMID: 14816400.

Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, Lockhart PB, Patton LL, Porter S, Thornhill MH. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Jan;64(1):16-28. doi: 10.1016/j.addr.2011.02.008. Epub 2011 Mar 1. PubMed PMID: 21371513.

Heikkilä P, Harlin A. Parameter study of electrospinning of Polyamide-6. *Eur Polymer J.* 2008;44(10):3067-79. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2008.06.032.

Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral

Cavity. *Head Neck Pathol.* 2019 Mar;13(1):25-32. doi: 10.1007/s12105-019-01004-6. Epub 2019 Jan 29. PubMed PMID: 30693459.

Hilgert JB, Giordani JMA, Souza RF, Da Ros Wendland EM, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the Management of Denture Stomatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Geriatr Soc.* 2016 Dec;64(12):2539-45. doi: 10.1111/jgs.14399. Epub 2016 Nov 27. PubMed PMID: 27889906.

Hivechi A, Bahrami SH, Siegel RA. Drug release and biodegradability of electrospun cellulose nanocrystal reinforced polycaprolactone. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Jan 1;94:929-937. doi: 10.1016/j.msec.2018.10.037. Epub 2018 Oct 9. PubMed PMID: 30423781.

Hotta Juliana. Viabilidade do uso de dispositivo acrílico intra-oral reembasado por material resiliente temporário modificado por antimicrobianos: estudo preliminar em ratos [dissertação]. Bauru (SP): Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.

Hotta J, Cral WG, Sakima VT, Lara VS, Urban VM, Neppelenbroek KH. Intraoral Device for Optimal Antifungal Delivery in a Rat Model. *Curr Drug Deliv.* 2017;14(5):658-667. doi: 10.2174/1567201813666161013122115. PubMed PMID: 27739378.

Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A Review on Polymers Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. *Comp Sci Tech.* 2003;63(15):2223-53. doi: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.

Hu L, He C, Zhao C, Chen X, Hua H, Yan Z. Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microb Pathog.* 2019 Sep;134:103575. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103575. Epub 2019 Jun 5. PubMed PMID: 31175972.

Husain O, Lau W, Edirisinghe M, Parhizkar M. Investigating the particle to fibre transition threshold during electrohydrodynamic atomization of a polymer solution. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 Aug 1;65:240-50. doi: 10.1016/j.msec.2016.03.076. Epub 2016 Mar 24. PubMed PMID: 27157749.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa nacional de saúde: 2019: percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 113p. ISBN 978-65-87201-33-7.

Jacobsen ID, Grosse K, Berndt A, Hube B. Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. PLoS One. 2011;6(5):e19741. doi: 10.1371/journal.pone.0019741. Epub 2011 May 13. Erratum in: PLoS One. 2011;6(6). doi:10.1371/annotation/1912450a-b5a7-4dbe-bc2a-cd93579fb0dd. PubMed PMID: 21603634.

Jennings KJ, MacDonald DG. Rat palatal histology related to denture-like appliances. J Dent. 1992 Aug;20(4):250-4. doi: 10.1016/0300-5712(92)90098-w. PubMed PMID: 1385503.

Jensen SB, Vissink A. Salivary gland dysfunction and xerostomia in Sjögren's syndrome. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2014 Feb;26(1):35-53. doi: 10.1016/j.coms.2013.09.003. PubMed PMID: 24287192.

Johnson CC, Yu A, Lee H, Fidel PL Jr, Noverr MC. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. Infect Immun. 2012 May;80(5):1736-43. doi: 10.1128/IAI.00019-12. Epub 2012 Mar 5. PubMed PMID: 22392931.

Jones JH, Adams D. Experimentally induced acute oral candidosis in the rat. Br J Dermatol. 1970 Dec;83(6):670-3. doi: 10.1111/j.1365-2133.1970.tb15762.x. PubMed PMID: 5492478.

Jorge, AOC. Princípios de Microbiologia e Imunologia. Edição. São Paulo: Editora Santos: 2006. 418p. ISBN 9788572885362.

Junqueira JC, Martins Jda S, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. Lasers Med Sci. 2009 Nov;24(6):877-84. doi: 10.1007/s10103-009-0673-4. Epub 2009 May 1. PubMed PMID: 19408038.

Junqueira JC, Vilela SFG, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, Rasteiro VMC, et al. Oral colonization by yeasts in HIV- positive patients in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2012; 54:17–24. doi: 10.1590/S0036-46652012000100004.

Karuppuswamy P, Venugopal JR, Navaneethan B, Laiva AL, Ramakrishna A. Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride. Mater. Lett. 2015 Feb;141:180-6. doi: 10.1016/j.matlet.2014.11.044.

Kenawy ER, Abdel-Hay FI, El-Newehy MH, Wnek GE. Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems. 2009 Jan;113(1):296-302. doi: 10.1016/j.matchemphys.2008.07.081.

Khalf A, Madihally SV. Recent advances in multiaxial electrospinning for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 Mar;112:1-17. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.11.010. Epub 2016 Nov 16. PubMed PMID: 27865991.

Khorrarnizadeh MR, Saadat F. Animal models for human disease. *Animal Biotechnology.* 2020. 153–171 p.

Kidd SE, Abdolrasouli A, Hagen F. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. *Open Forum Infect Dis.* 2023 Jan 7;10(1):ofac559. doi: 10.1093/ofid/ofac559. PubMed PMID: 36632423.

Kumamoto CA, Vines MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 2005;59:113-33. doi: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121034. PubMed PMID: 16153165.

Kuramoto T. Positional cloning of rat mutant genes reveals new functions of these genes. *Exp Anim.* 2023 Feb 21;72(1):1-8. doi: 10.1538/expanim.22-0089. Epub 2022 Sep 3. PubMed PMID: 36058846.

Labban N, Taweel SMA, ALRabiah MA, Alfouzan AF, Alshiddi IF, Assery MK. Efficacy of Rose Bengal and Curcumin mediated photodynamic therapy for the treatment of denture stomatitis in patients with habitual cigarette smoking: A randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021 Sep;35:102380. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102380. Epub 2021 Jun 1. PubMed PMID: 34087468.

Lam JK, Xu Y, Worsley A, Wong IC. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Jun;73:50-62. doi: 10.1016/j.addr.2013.08.011. Epub 2013 Aug 31. PubMed PMID: 23999459.

Lamb DJ, Douglas CW. Treatment of denture stomatitis by a sustained drug-delivery device: a preliminary study. *J Dent.* 1988 Oct;16(5):219-21. doi: 10.1016/0300-5712(88)90075-9. PubMed PMID: 3216061.

Lambson GO, Anderson RR. Palatal papillary hyperplasia. *J Prosthet Dent.* 1967 Dec;18(6):528-33. doi: 10.1016/0022-3913(67)90217-x. PubMed PMID: 4863770.

Lass-Flörl C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs.* 2011 Dec 24;71(18):2405-19. doi: 10.2165/11596540-000000000-00000. PubMed PMID: 22141384.

Lavaee F, Motaghi D, Jassbi AR, Jafarian H, Ghasemi F, Badiee P. Antifungal effect of the bark and root extracts of *Punica granatum* on oral *Candida isolates*. *Curr Med Mycol.* 2018 Dec;4(4):20-24. doi: 10.18502/cmm.4.4.382. PubMed PMID: 30815613.

Lee DJ, Saponaro PC. Management of Edentulous Patients. *Dent Clin North Am*. 2019 Apr;63(2):249-261. doi: 10.1016/j.cden.2018.11.006. Epub 2019 Jan 30. PubMed PMID: 30825989.

Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Adv Mater*. 2004;16(14):1151–70. doi: 10.1002/adma.200400719.

Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Dec 10;59(14):1392-412. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.021. Epub 2007 Aug 25. PubMed PMID: 17884240.

Liu Y, Nelson T, Chakroff J, Cromeens B, Johnson J, Lannutti J, Besner GE. Comparison of polyglycolic acid, polycaprolactone, and collagen as scaffolds for the production of tissue engineered intestine. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019. Apr;107(3):750-60. doi: 10.1002/jbm.b.34169. Epub 2018 Sep 30. doi: 10.1002/jbm.b.34169. PubMed PMID: 30270503.

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jan;16(1):19-31. doi: 10.1038/nrmicro.2017.107. Epub 2017 Oct 3. PubMed PMID: 29062072.

Loster JE, Wieczorek A, Loster BW. Correlation between age and gender in *Candida* species infections of complete denture wearers: a retrospective analysis. *Clin Interv Aging*. 2016 Nov 21;11:1707-1714. doi: 10.2147/CIA.S116658. PubMed PMID: 27920509.

Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Mar 16;10:1161-71. doi: 10.2147/DDDT.S100795. PubMed PMID: 27042008.

Macedo CR, Macedo EC, Torloni MR, Silva AB, Prado GF. Pharmacotherapy for sleep bruxism. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Oct 23;(10):CD005578. doi: 10.1002/14651858.CD005578.pub2. PubMed PMID: 25338726.

Maciel Quatrin P, Flores Dalla Lana D, Andrzejewski Kaminski TF, Meneghello Fuentefria A. Fungal infection models: Current progress of ex vivo methods. *Mycoses*. 2019 Oct;62(10):860-873. doi: 10.1111/myc.12961. Epub 2019 Aug 4. PubMed PMID: 31271676.

Mandali G, Sener ID, Turker SB, Ulgen H. Factors affecting the distribution and prevalence of oral mucosal lesions in complete denture wearers. *Gerodontology*. 2011 Jun;28(2):97-103. doi: 10.1111/j.1741-2358.2009.00351.x. Epub 2010 Jun 23. PubMed PMID: 20579108.

- Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Mar;62(1):71-109. doi: 10.1128/MMBR.62.1.71-109.1998. PubMed PMID: 9529888.
- Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia.* 2014 Jun;177(5-6):223-40. doi: 10.1007/s11046-014-9749-1. Epub 2014 May 1. PubMed PMID: 24789109
- Martori E, Ayuso-Montero R, Martinez-Gomis J, Viñas M, Peraire M. Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population. *J Prosthet Dent.* 2014 Apr;111(4):273-9. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.07.015. Epub 2013 Dec 17. PubMed PMID: 24355508.
- Matsuo H, Suenaga H, Takahashi M, Suzuki O, Sasaki K, Takahashi N. Deterioration of polymethyl methacrylate dentures in the oral cavity. *Dent Mater J.* 2015;34(2):234-9. doi: 10.4012/dmj.2014-089. Epub 2015 Feb 25. PubMed PMID: 25740307.
- Mercante LA, Correa DS. Eletrofiação e nanofibras: fundamentos e aplicações [e-book]. Ponta Grossa: Atena Editora; 2023. 532 p. ISBN 9786525821528.
- Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2007 Sep;54(3):201-35. doi: 10.1556/AMicr.54.2007.3.1. PubMed PMID: 17896473.
- Mondal D, Griffith M, Venkatraman SS. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *Int J Polym Mater Po.* 2016 Jan; 65(5): 255-65. doi: 10.1080/00914037.2015.1103241.
- Monteiro AP, Rocha CM, Oliveira MF, Gontijo SM, Agudelo RR, Sinisterra RD, Cortés ME. Nanofibers containing tetracycline/ $\beta$ -cyclodextrin: Physico-chemical characterization and antimicrobial evaluation. *Carbohydr Polym.* 2017 Jan 20;156:417-426. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.059. Epub 2016 Sep 18. PubMed PMID: 27842841.
- Moraes GS. Validação de modelo de indução de candidose bucal e avaliação da toxicidade sistêmica aguda à clorexidina em ratos Wistar [dissertação]. Ponta Grossa (PR): Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG); 2018.
- Moraes GS, Albach T, Sugio CY, de Oliveira FB, Neppelenbroek KH, Urban VM. Experimental animal models for denture stomatitis: A methodological review. *Lab Anim.* 2022 Aug;56(4):331-343. doi: 10.1177/00236772211069249. Epub 2022 Jan 24. PubMed PMID: 35072576.

Moraes GS, Cachoeira VS, Alves FMC, Kiratcz F, Albach T, Bueno MG, Neppelenbroek KH, Urban VM. Is there an optimal method to detach *Candida albicans* biofilm from dental materials? J Med Microbiol. 2021 Oct;70(10). doi: 10.1099/jmm.0.001436. PubMed PMID: 34623230.

Moraes GS, Albach T, Ramos IE, Kopacheski MG, Cachoeira VS, Sugio CYC, Galvão Arrais CA, Neppelenbroek KH, Urban VM. A novel acrylic resin palatal device contaminated with *Candida albicans* biofilm for denture stomatitis induction in Wistar rats. J Appl Oral Sci. 2021 Apr 19;29:e20200865. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0865. PubMed PMID: 33886943.

Morton WM, inventor. Method of dispersing fluids. US Patent Specification 705691. 1902 Jul.

Muscat Y, Farrugia C, Camilleri L, Arias-Moliz MT, Valdramidis V, Camilleri J. Investigation of Acrylic Resin Disinfection Using Chemicals and Ultrasound. J Prosthodont. 2018 Jun;27(5):461-468. doi: 10.1111/jopr.12511. Epub 2016 May 31. PubMed PMID: 27244668.

Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. Prog. Polym. Sci. 2007; 8(32) 762–798. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.

Neppelenbroek KH. Sustained drug-delivery system: a promising therapy for denture stomatitis? J Appl Oral Sci. 2016 Sep-Oct;24(5):420-422. doi: 10.1590/1678-77572016ed003. Pubmed PMID: 27812610.

Neppelenbroek KH, Falcão Procópio AL, Gurgel Gomes AC, Campos Sugio CY, Maia Neves Garcia AA, Porto VC, Urban VM. A modified Newton classification for denture stomatitis. Prim Dent J. 2022 Jun;11(2):55-58. doi: 10.1177/20501684221101095. PubMed PMID: 35658661.

Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an *in vivo* *Candida albicans* biofilm denture model. Infect Immun. 2010 Sep;78(9):3650-9. doi: 10.1128/IAI.00480-10. Epub 2010 Jul 6. PubMed PMID: 20605982.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. Patologia oral e maxilofacial. 4ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier: 2016. ISBN 978-85-352-3089-5.

New Science Magazine [Internet]. [cited 2002 Mai 30]. Just 2.5% of DNA turns mice into men. Available from: <https://www.newscientist.com/article/dn2352-just-2-5-of-dna-turns-mice-into-men/>.

Newton AV. Denture sore mouth, a possible aetiology. Br Dent J. 1962;112:357-60.

Ninomiya K, Maruyama N, Inoue S, Ishibashi H, Takizawa T, Oshima H, Abe S. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(6):861-5. doi: 10.1248/bpb.35.861. PubMed PMID: 22687476.

Nivoix Y, Ledoux MP, Herbrecht R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020 Feb;41(1):158-174. doi: 10.1055/s-0039-3400291. Epub 2020 Jan 30. PubMed PMID: 32000291.

Norton CL, inventor. Method of and apparatus for producing fibrous or filamentary material. US Patent Specification 677277. 1936 Jul.

O'Donnell LE, Alalwan HKA, Kean R, Calvert G, Nile CJ, Lappin DF, Robertson D, Williams C, Ramage G, Sherry L. *Candida albicans* biofilm heterogeneity does not influence denture stomatitis but strongly influences denture cleansing capacity. *J Med Microbiol*. 2017 Jan;66(1):54-60. doi: 10.1099/jmm.0.000419. Epub 2017 Feb 6. PubMed PMID: 28032543.

Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990 Feb;48(1):71-4. doi: 10.3109/00016359009012736. PubMed PMID: 2181813.

Olsen I, Bondevik O. Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. *Scand J Dent Res*. 1978 Sep;86(5):392-8. doi: 10.1111/j.1600-0722.1978.tb00642.x. PubMed PMID: 281760.

Olsen I, Haanaes HR. Experimental palatal candidosis and saliva flow in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1977 Jan-Feb;85(2):135-41. doi: 10.1111/j.1600-0722.1977.tb00544.x. PubMed PMID: 402689.

Orsi IA, Junior AG, Villabona CA, Fernandes FH, Ito IY. Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerised acrylic resin. *Gerodontology*. 2011 Dec;28(4):253-7. doi: 10.1111/j.1741-2358.2010.00400.x. Epub 2010 Jul 1. PubMed PMID: 20609007.

Ortiz A, Sansinenea E. The Chemistry of Drugs to Treat *Candida albicans*. *Curr Top Med Chem*. 2019;19(28):2554-2566. doi: 10.2174/1568026619666191025153124. PubMed PMID: 31654511.

Pathmashri.VP, Abirami. A Review on Denture Stomatitis. *J. Pharm. Sci. & Res*. 2016;8(8):875-877.

Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies. *Front Microbiol*. 2015 Dec 17;6:1391. doi: 10.3389/fmicb.2015.01391. PubMed PMID: 26733948.

Pawar V, Srivastava R. Chitosan-polycaprolactone blend sponges for management of chronic osteomyelitis: A preliminary characterization and *in vitro* evaluation. *Int J Pharm*. 2019 Sep 10;568:118553. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118553. Epub 2019 Jul 22. PubMed PMID: 31344444.

Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Pereira Costa AC, Back-Brito GN, Kaminagakura E, Jorge AO. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Aug;76(4):419-24. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.001. Epub 2013 Jun 7. PubMed PMID: 23747028.

Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol*. 2021 Jul;131(1):11-22. doi: 10.1111/jam.14949. Epub 2020 Dec 9. PubMed PMID: 33249681.

Philipsen HP, Cleaton-Jones P, Fisker AV. Correlative light microscopic and scanning electron microscopic study of completely and incompletely orthokeratinized rat oral epithelium. *Scand J Dent Res*. 1982 Aug;90(4):255-62. doi: 10.1111/j.1600-0722.1982.tb00735.x. PubMed PMID: 6182602.

Piérard GE, Arrese JE, Piérard-Franchimont C. Itraconazole. *Expert Opin Pharmacother*. 2000 Jan;1(2):287-304. doi: 10.1517/14656566.1.2.287. PubMed PMID: 11249550.

Pillay V, Dott C, Choonara YE, Tyagi C, Tomar L, Kumar P, du Toit LC, Valence M. Ndesendo VMK. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *J. Nanomater*. 2013 Feb. doi: 10.1155/2013/789289.

Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol*. 2021 Feb;47(1):91-111. doi: 10.1080/1040841X.2020.1843400. Epub 2021 Jan 22. PubMed PMID: 33482069.

Potrč T, Baumgartner S, Roškar R, Planinšek O, Lavrič Z, Kristl J, Kocbek P. Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2015 Jul 30;75:101-13. doi: 10.1016/j.ejps.2015.04.004. Epub 2015 Apr 21. PubMed PMID: 25910438.

Queen A, Singla L, Goyal RR. Denture stomatitis. *International Journal of Health Sciences*. 2021; 5(S2):1–5. doi: 10.53730/ijhs.v5nS2.5130.

Rai A, Misra SR, Panda S, Sokolowski G, Mishra L, Das R, et al. Nystatin Effectiveness in Oral Candidiasis Treatment: A Systematic Review & Meta-Analysis of Clinical Trials. *Life (Basel)*. 2022 Oct 22;12(11):1677. doi: 10.3390/life12111677. PubMed PMID: 36362833.

R AN, Rafiq NB. Candidiasis. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023 May 29. PubMed PMID: 32809459.

Reneker DH, Yarin AL. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*. 2008;49(10):2387-425. doi: 10.1016/j.polymer.2008.02.002.

Ribeiro FC, Junqueira JC, Dos Santos JD, de Barros PP, Rossoni RD, Shukla S, Fuchs BB, Shukla A, Mylonakis E. Development of Probiotic Formulations for Oral Candidiasis Prevention: Gellan Gum as a Carrier To Deliver *Lactobacillus paracasei* 28.4. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 May 21;64(6):e02323-19. doi: 10.1128/AAC.02323-19. PubMed PMID: 32253208.

Rodríguez Acosta EJ, da Silva PM, Jacobina M, Lara VS, Neppelenbroek KH, Porto VC. *Candida albicans* adherence to denture base material: chemical disinfection and the effect of acquired salivary pellicle formation. *J Prosthodont*. 2015 Apr;24(3):200-6. doi: 10.1111/jopr.12197. Epub 2014 Aug 20. PubMed PMID: 25142962.

Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SF, dos Santos JD, de Barros PP, Prata MC, Anbinder AL, Fuchs BB, Jorge AO, Mylonakis E, Junqueira JC. Competitive Interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during Biofilm Formation and Development of Experimental Candidiasis. *PLoS One*. 2015 Jul 6;10(7):e0131700. doi: 10.1371/journal.pone.0131700. PubMed PMID: 26146832.

Rossoni RD, de Barros PP, Lopes LADC, Ribeiro FC, Nakatsuka T, Kasaba H, Junqueira JC. Effects of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate on *Candida spp.*: antifungal activity, anti-biofilm properties, and protective effects on *Galleria mellonella* against *C. albicans* infection. *Biofouling*. 2019 Oct;35(9):997-1006. doi: 10.1080/08927014.2019.1686485. Epub 2019 Nov 11. PubMed PMID: 31710252.

Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(14):1384-91. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.020.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A, Petruzzi M, Serpico R. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1;16(2):e139-43. doi: 10.4317/medoral.16.e139. PubMed PMID: 20711156.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):398-429. doi: 10.1128/CMR.14.2.398-429.2001. PubMed PMID: 11292645.

Sanitá PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Int J Prosthodont*. 2012 May-Jun;25(3):232-44. PubMed PMID: 22545252.

Santos JD. Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de nanofibras de policaprolactona - nistatina produzidas por eletrofiação [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust Dent J*. 1997 Oct;42(5):343-6. doi: 10.1111/j.1834-7819.1997.tb00141.x. PubMed PMID: 9409052.

Scalercio M, Valente T, Israel MS, Ramos ME. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. *RGO (Porto Alegre)*. 2007 Out-Dez;55(4): 395-398.

Scheibler E, Garcia MCR, Medina da Silva R, Figueiredo MA, Salum FG, Cherubini K. Use of nystatin and chlorhexidine in oral medicine: Properties, indications and pitfalls with focus on geriatric patients. *Gerodontology*. 2017 Sep;34(3):291-298. doi: 10.1111/ger.12278. Epub 2017 May 29. PubMed PMID: 28556195.

Schwartz IS, Young JM, Berrong JM. The effect of Listerine antiseptic on denture microbial flora and denture stomatitis. *Int J Prosthodont*. 1988 Sep-Oct;1(2):153-8. PubMed PMID: 3250571.

Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Induced palatal candidosis in the wistar rat. *Arch Oral Biol*. 1981;26(10):787-93. doi: 10.1016/0003-9969(81)90174-6. PubMed PMID: 7036963.

Shakya P, Madhav NV, Shakya AK, Singh K. Palatal mucosa as a route for systemic drug delivery: A review. *J Control Release*. 2011 Apr 10;151(1):2-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.003. Epub 2010 Nov 6. PubMed PMID: 21059376.

Shukla PK, Singh P, Yadav RK, Pandey S, Bhunia SS. *Topics in Medicinal Chemistry*. Saxena: Springer. 2016;29. doi: 10.1007/7355\_2016\_4. ISBN: 978-3-319-78254-6.

Sill TJ, Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(13):1989-2006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011. Epub 2008 Feb 20. PubMed PMID: 18281090.

Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014 Sep;18(Suppl 1):S81-5. doi: 10.4103/0973-029X.141325. PubMed PMID: 25364186.

Sisson AL, Ekinci D, Lendlein A. The contemporary role of  $\epsilon$ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures. *Polym J*. 2013 Aug; 54(17):4333-50. doi: 10.1016/j.polymer.2013.04.045.

Stevens VM, Mueller SW, Reynolds PM, MacLaren R, Kiser TH. Extrapolating Antifungal Animal Data to Humans - Is it reliable? *Curr Fungal Infect Rep*. 2020 Mar;14(1):50-62. doi: 10.1007/s12281-020-00370-x. Epub 2020 Jan 16. PubMed PMID: 32201545.

Sugio CYC, Garcia AAMN, Albach T, Moraes GS, Bonfante EA, Urban VM, Neppelenbroek KH. *Candida*-Associated Denture Stomatitis and Murine Models: What Is the Importance and Scientific Evidence? *J Fungi (Basel)*. 2020 May 23;6(2):70. doi: 10.3390/jof6020070. PubMed PMID: 32456172.

Sugio CYC, Robles-Mengoia MG, Gomes ACG, Garcia AAMN, Oliveira TM de, Neppelenbroek KH. Use of natural products in the prevention and treatment of denture stomatitis. [Internet]. *Open Access Journal of Biomedical Science*. 2020 Ago;2(1):201-206. doi:10.38125/OAJBS.000146.

Sultan AS, Rizk AM, Vila T, Ji Y, Masri R, Jabra-Rizk MA. Digital Design of a Universal Rat Intraoral Device for Therapeutic Evaluation of a Topical Formulation against *Candida*-Associated Denture Stomatitis. *Infect Immun*. 2019 Nov 18;87(12):e00617-19. doi: 10.1128/IAI.00617-19. PubMed PMID: 31527130.

Távora FFF, Chocano APC, Oliveira DG, Pereira JR, Almeida RS, Neppelenbroek KH, Porto VC. Beneficial Effects of Ethyl-Cyanoacrylate Coating Against *Candida albicans* Biofilm Formation. *Braz Dent J*. 2019 Jun;30(3):266-271. doi: 10.1590/0103-6440201901953. Epub 2019 Jun 3. PubMed PMID: 31166390.

Thakkar S, Misra M. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Sep 30;107:148-167. doi: 10.1016/j.ejps.2017.07.001. Epub 2017 Jul 8. PubMed PMID: 28690099.

Teoh SH, Goh BT, Lim J. Three-Dimensional Printed Polycaprolactone Scaffolds for Bone Regeneration Success and Future Perspective. *Tissue Eng Part A*. 2019 Jul;25(13-14):931-935. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0102. PubMed PMID: 31084409.

Tobin DM, May RC, Wheeler RT. *Zebrafish*: a see-through host and a fluorescent toolbox to probe host-pathogen interaction. *PLoS Pathog*. 2012 Jan;8(1):e1002349. doi: 10.1371/journal.ppat.1002349. Epub 2012 Jan 5. PubMed PMID: 22241986.

Tobouti PL, Casaroto AR, de Almeida RS, de Paula Ramos S, Dionísio TJ, Porto VC, Santos CF, Lara VS. Expression of Secreted Aspartyl Proteinases in an Experimental Model of *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2016 Feb;25(2):127-34. doi: 10.1111/jopr.12285. Epub 2015 Apr 7. PubMed PMID: 25857681.

Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication of a novel scaffold of clotrimazole-microemulsion-containing nanofibers using an electrospinning process for oral candidiasis applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015 Feb 1;126:18-25. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.12.009. Epub 2014 Dec 13. PubMed PMID: 25543979.

United Nations. Population Division World Population Ageing 2019. New York: Department of Economic and Social Affairs: 2020. ISBN: 978-92-1-148326-0.

Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev*. 1999 Nov 10;99(11):3181-98. doi: 10.1021/cr940351u. PubMed PMID: 11749514.

Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys*. 2011 Jun 15;49(12):832-864. doi: 10.1002/polb.22259. PubMed PMID: 21769165.

Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *J Dent*. 2013 May;41(5):420-7. doi: 10.1016/j.jdent.2013.02.012. Epub 2013 Feb 28. PubMed PMID: 23454226.

Valentini-Mioso F, Maske TT, Cenci MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Chemical hygiene protocols for complete dentures: A crossover randomized clinical trial. *J Prosthet Dent*. 2019 Jan;121(1):83-89. doi: 10.1016/j.prosdent.2017.12.022. Epub 2018 Jul 14. PMID: 30017164.

Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*. 2012;2012:713687. doi: 10.1155/2012/713687. Epub 2011 Dec 1. PubMed PMID: 22187560.

Van Natta FJ, Hill JW, Carothers WH. Studies of Polymerization and Ring Formation. XXIII.1  $\epsilon$ -Caprolactone and its Polymers. *J. Am. Chem. Soc*. 1934 Feb; 56(2):455-7. doi: 10.1021/ja01317a053.

Verma AH, Zafar H, Ponde NO, Hepworth OW, Sihra D, Aggor FEY, Ainscough JS, Ho J, Richardson JP, Coleman BM, Hube B, Stacey M, McGeachy MJ, Naglik JR, Gaffen SL, Moyes DL. IL-36 and IL-1/IL-17 Drive Immunity to Oral Candidiasis via Parallel Mechanisms. *J Immunol*. 2018 Jul 15;201(2):627-634. doi: 10.4049/jimmunol.1800515. Epub 2018 Jun 11. PubMed PMID: 29891557.

Veras FF, Roggia I, Pranke P, Pereira CN, Brandelli A. Inhibition of filamentous fungi by ketoconazole-functionalized electrospun nanofibers. *Eur J Pharm Sci*. 2016 Mar 10;84:70-6. doi: 10.1016/j.ejps.2016.01.014. Epub 2016 Jan 15. PubMed PMID: 26775870.

- Villa A, Connell CL, Abati S. Diagnosis and management of xerostomia and hyposalivation. *Ther Clin Risk Manag*. 2014 Dec 22;11:45-51. doi: 10.2147/TCRM.S76282. PubMed PMID: 25653532.
- Wani KD, Kadu BS, Mansara P, Gupta P, Deore AV, Chikate RC, Poddar P, Dhole SD, Kaul-Ghanekar R. Synthesis, characterization and *in vitro* study of biocompatible cinnamaldehyde functionalized magnetite nanoparticles (CPGF Nps) for hyperthermia and drug delivery applications in breast cancer. *PLoS One*. 2014 Sep 30;9(9):e107315. doi: 10.1371/journal.pone.0107315. Retraction in: *PLoS One*. 2023 Jan 10;18(1):e0280492. PubMed PMID: 25268975.
- Wang J, Windbergs M. Controlled dual drug release by coaxial electrospun fibers – Impact of the core fluid on drug encapsulation and release. *Int J Pharm*. 2019 Feb 10;556:363-371. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.026. Epub 2018 Dec 18. PubMed PMID: 30572080.
- Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(30):5897-909. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027. Epub 2009 Aug 3. PubMed PMID: 19651435.
- Winau F, Westphal O, Winau R. Paul Ehrlich--in search of the magic bullet. *Microbes Infect*. 2004 Jul;6(8):786-9. doi: 10.1016/j.micinf.2004.04.003. PubMed PMID: 15207826.
- Wong SS, Kao RY, Yuen KY, Wang Y, Yang D, Samaranayake LP, Seneviratne CJ. *In vitro* and *in vivo* activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. *PLoS One*. 2014 Jan 22;9(1):e85836. doi: 10.1371/journal.pone.0085836. PubMed PMID: 24465737.
- Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010 Oct; 35(10):1217-56. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chem Rev*. 2019 Apr 24;119(8):5298-5415. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593. Epub 2019 Mar 27. PubMed PMID: 30916938.
- Yu DG, Li JJ, Williams GR, Zhao M. Electrospun amorphous solid dispersions of poorly water-soluble drugs: A review. *J Control Release*. 2018 Dec 28;292:91-110. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.08.016. Epub 2018 Aug 14. PubMed PMID: 30118788.
- Yu H, Chong SK, Hassanbhai AM, Teng Y, Balachander G, Muthukumaran P, et al. *Principles of bioreactor design for tissue engineering*. 5th ed. Boston: Academic Press. 2020. 179–203 p.

Yousefi H, Abdollahi M. An Update on Drug-induced Oral Reactions. *J Pharm Pharm Sci.* 2018;21(1):171-183. doi: 10.18433/jpps29893. PubMed PMID: 29789102.

Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, Lounes-Hadj Sahraoui A, Fontaine J, Sanchez H, Hatfield RD, Ntambi JM, Nett JE, Mitchell AP, Andes DR. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio.* 2014 Aug 5;5(4):e01333-14. doi: 10.1128/mBio.01333-14. PubMed PMID: 25096878.

Zegarelli EV, Kutscher AH, Herlands RE, Lucca JJ, Silvers HF. Oral Lesions of Interest to the Prosthodontist, Part I. Denture Stomatitis, *J. Pros Dent.* 1961;11:617.

Zhai B, Ola M, Rolling T, Tosini NL, Joshowitz S, Littmann ER, et al. High-resolution mycobiota analysis reveals dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. *Nat Med.* 2020 Jan;26(1):59-64. doi: 10.1038/s41591-019-0709-7. Epub 2020 Jan 6. PubMed PMID: 31907459.

Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):104-12. doi: 10.1016/j.addr.2012.10.003. PubMed PMID: 23088863.

Zhang L, Pornpattananangku D, Hu CM, Huang CM. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem.* 2010;17(6):585-94. doi: 10.2174/092986710790416290. PubMed PMID: 20015030.

Zipfel PF, Skerka C. From magic bullets to modern therapeutics: Paul Ehrlich, the German immunobiologist and physician coined the term 'complement'. *Mol Immunol.* 2022 Oct;150:90-98. doi: 10.1016/j.molimm.2022.08.002. Epub 2022 Aug 23. PubMed PMID: 36027818.

Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, Sedaghat F, Vosoghi M. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2011 Feb;49(2):208-11. doi: 10.3109/13693786.2010.507605. Epub 2010 Aug 26. PubMed PMID: 20795762.

Zotchev SB. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Curr Med Chem.* 2003 Feb;10(3):211-23. doi: 10.2174/0929867033368448. PMID: 12570708.

Zuluaga DJM, Velandia OCG, Clauijo DMR. Denture-related stomatitis managed with tissue conditioner and hard autopolymerising reline material. *Gerodontology.* 2011 Dec;28(4):258-63. doi: 10.1111/j.1741-2358.2010.00398.x. Epub 2010 Nov 5. PubMed PMID: 21054506.

## ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



### CERTIFICADO CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo registrado sob o nº 04/2021, intitulado:- **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA: ESTUDO IN VIVO**, sob a responsabilidade de **ALEXANDRE LUIZ SOUTO BORGES**, tendo como colaboradores:- NATÁLIA INÊS GONÇALVES, JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA, LIVIA MARA ALVES FIGUEIREDO GODOI, MAÍRA TERRA GARCIA e PAULO HENRIQUE FONSECA DO CARMO, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 22/02/2021 e alterado em 19/06/2023.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	02/08/2021 a 31/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato/heterogênico Wistar albino
Nº de Animais	48
Peso/Idade	250 gr – 300 gr – 45 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Alterações	A) Inclusão do nome do colaborador: Paulo Henrique Fonseca do Carmo B) Alteração do prazo de autorização de vigência de 02/08/2021 a 30/12/2022, para 02/08/2021 a 31/12/2023.

São José dos Campos, 28 de julho de 2021

Prof. Dra ANDREA CARVALHO DE MARCO  
COORDENADORA/CEUA