



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



Norberto Martins de Oliveira Junior

**Influência da utilização de adesivos para prótese na adesão e formação de
biofilme simples e misto**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Norberto Martins de Oliveira Junior

**Influência da utilização de adesivos para prótese na adesão e formação de
biofilme simples e misto**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, área de Prótese.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein.

Araraquara

2018

Oliveira Junior, Norberto Martins de

Influência da utilização de adesivos para prótese na adesão e formação de biofilme simples e misto / Norberto Martins de Oliveira Junior.-- Araraquara: [s.n.], 2018

103 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

1. Prótese total 2. Adesivos 3. Microbiologia I. Título

Norberto Martins de Oliveira Junior

**Influência da utilização de adesivos para prótese na adesão e formação de
biofilme simples e misto**

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

Professor Titular do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Carolina Pero

Professora Livre Docente do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

3º Examinador: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

Professora Assistente Doutor do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

4º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Professora Livre Docente do Departamento de Prótese e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP.

5º Examinador: Profa. Dra. Claudia Helena Lovato da Silva

Professora Associada do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP.

Araraquara, 29 de janeiro de 2018.

DADOS CURRICULARES

Norberto Martins de Oliveira Junior

Nascimento	22.01.1989 - São Carlos - SP
Filiação	Norberto Martins de Oliveira Cleuvina Baroni Martins de Oliveira
2004/2006	Ensino Médio Colégio São Carlos
2007/2011	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2012/2014	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Prótese), nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2014/2018	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Prótese), nível de Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

A Deus

Que me dá muita força e saúde para vencer a cada dia e seguir em frente com meus sonhos, que me permitiu nascer em uma família linda e que me proporcionou tudo que sempre precisei, e que me guiou pelo caminho do bem e preparou tudo em minha vida para acontecer na hora certa.

Aos meus Pais Norberto e Cleuvina

Meus amados pais, que sempre acreditaram em mim, incentivaram, apoiaram e proporcionaram simplesmente tudo em minha vida. Me criaram de maneira exemplar e me guiaram pelo caminho do estudo, por isso vocês são os grandes responsáveis também pela minha chegada até este ponto da carreira profissional. Sou muito grato a Deus por ter vocês como meus pais!

Vocês representam meu grande e eterno exemplo nesta vida! Amo muito vocês!

À minha esposa Tauane

Tudo aconteceu como deveria acontecer, e foi perfeito assim. A partir do momento que te encontrei, que coincide com o fim de meu Mestrado e início de meu Doutorado, conheci uma nova vida, que você me ensinou a viver. Ao seu lado me vi feliz como nunca fui. Como companheiros de vida e de pós-graduação, nos incentivamos diariamente e somos muito mais fortes. Além disso, você teve grande influência no desenvolvimento deste trabalho. Quantos problemas relacionados à minha pesquisa você me ajudou a resolver, e quantas vezes discutimos minha metodologia juntos?

Você me representa, além de amor, um grande incentivo durante minha trajetória no Doutorado.

Muito Obrigado por tudo! Te amo muito e para sempre!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

Meu grande orientador nestes 10 anos de vida científica. Durante meu Doutorado pude conhecer ainda mais sobre seu caráter e índole, sempre me auxiliando na resolução dos problemas da maneira mais sensata, compreensiva e humana possível. Muito obrigado por sua orientação, confiança, apoio e toda contribuição em meu processo de aprendizado ao longo desses anos de convivência. Sinto-me privilegiado por tê-lo como orientador.

À Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Pero Vizoto

Pela amizade que desenvolvemos durante os anos, pelos momentos de descontração e por toda sua contribuição em minha vida na pós-graduação. Vejo você como uma grande orientadora e líder, que se dedica pela harmonia de nosso grupo de pesquisa de maneira humana e amiga, acima de tudo. Considero como uma grande co-orientadora que sempre esteve disposta a ajudar e contribuir no que fosse necessário. Muito obrigado por tudo!

À Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein

Uma grande pesquisadora e profissional que tive o prazer de conviver e ter como co-orientadora durante meu doutorado, sempre disposta a se dedicar integralmente na orientação de seus alunos. Pude aprender vários conceitos de biologia molecular e microbiologia graças à sua ajuda. Sempre orientou da maneira mais eficiente possível durante todos os desdobramentos e dificuldades da pesquisa, estando sempre muito presente. Agradeço muito sua co-orientação neste trabalho! Sem sua ajuda ele não seria possível.

À minhas irmãs Maira e Sheila, aos meus sobrinhos Gabriel e Enzo, e ao meu cunhado Rogério a parte mais próxima de minha grande família, com os quais divido meus momentos de felicidade ou dificuldade, agradeço todo o apoio. Vocês representam meus laços eternos nesta vida e são muito importantes para mim!

Aos amigos do Grupo de Pesquisa: André, Larissa, Danny, Andressa, Gabi Giro, Vivian, Priscila, Ana Flávia, Marcela, Elen, Carina

Cada um em sua própria fase e em busca de seus sonhos e objetivos... Obrigado pela convivência, amizade e pelos momentos de descontração que fizeram a pós-graduação ser bem mais fácil. Agradeço também o conhecimento

compartilhado durante todos esses anos em que trabalhamos juntos, sem dúvida pude crescer muito com a convivência com cada um de vocês.

Aos todos meus companheiros da pós-graduação

Poderia me esquecer de alguém caso citasse nomes, por isso agradeço a todos aqueles que tive o prazer de conviver durante meus anos na pós-graduação... pessoal do laboratório de microbiologia, das diferentes áreas de prótese, companheiros de turma e de outras turmas, duplas em clínicas, brasileiros e estrangeiros... Obrigado pela convivência, amizade e aprendizados!

A todos os professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara

Muito obrigado pela convivência e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo de meus estudos!

A todos os funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, estagiários e bolsistas

Pela convivência, respeito, ajuda e companhia.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação

Pela atenção e pelos serviços a mim prestados.

Aos funcionários da Biblioteca

Por toda colaboração e auxílio.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Pela concessão de Bolsa de Doutorado.

Oliveira Junior NM de. Influência da utilização de adesivos para prótese na adesão e formação de biofilme simples e misto [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Objetivos: Verificar se os adesivos *Ultra Corega Creme* e *Corega Fita Adesiva* interferem na adesão e formação de biofilme simples e misto de *Candida albicans* e de *Lactobacillus casei*, e observar possíveis relações de sinergismo ou antagonismo entre as espécies. **Metodologia:** Espécimes em resina acrílica termopolimerizável (*Lucitone 550*) foram confeccionados (N=144), de formato circular e com rugosidade padronizada ($3,0 \mu\text{m} \pm 0,3$), e foram divididos em três grupos: Sem Adesivo, com Adesivo *Ultra Corega Creme* e com Adesivo *Corega Fita Adesiva*. Estes foram divididos em três subgrupos cada: *C. albicans* simples, *L. casei* simples e misto de *C. albicans* com *L. casei*. Foram feitos ensaios de adesão e de formação de biofilme em duplicata, resultando em 8 espécimes (n=8) por condição experimental. Foi observada a quantidade de cada micro-organismo nas superfícies dos espécimes através de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL e foi feita a caracterização dos espécimes através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), sendo utilizados 18 espécimes nesta análise (N=18), 2 por condição experimental (n=2). Análise de variância por ANOVA dois fatores e teste de *Tukey* para comparações múltiplas foram empregados, e um nível de significância de 0,05 foi obedecido para todas as comparações realizadas. **Resultados:** *L. casei* só apresentou diferença de adesão em uma situação de seu cultivo misto, na qual *L. casei* (misto) aderiu mais na situação *Sem Adesivo* do que quando o *Adesivo Creme* foi utilizado, já *C. albicans* (simples e misto) aderiu mais quando o *Adesivo Fita* foi utilizado. *C. albicans* tanto simples quanto misto aderiu mais quando comparado com *L. casei* (simples ou misto). *L. casei* (simples) formou mais biofilme na situação *Sem Adesivo*, já em seu cultivo misto com *C. albicans* não foi observada diferença em seu crescimento entre as situações testadas. *C. albicans* (simples e misto) formou mais biofilme quando o *Adesivo Fita* foi utilizado em relação ao *Adesivo Creme*, e o fungo formou mais biofilme quando comparado com *L. casei*. De um modo geral, sempre que uma mesma espécie foi comparada em sua situação simples e misto, tanto nas análises de adesão quanto de biofilme, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Durante a análise qualitativa observou-se que, nos ensaios de formação de biofilmes, *L. casei* simples na condição *Sem Adesivo* teve maior crescimento do que quando os adesivos testados eram utilizados, e *C. albicans* tanto simples quanto misto cresceu mais no *Adesivo Fita* do que no *Adesivo Creme*. **Conclusões:** (1) Não observou-se relações de sinergismo ou antagonismo entre os dois micro-organismos estudados; (2) *L. casei*, de maneira geral, não difere sua adesão quando adesivos são utilizados; (3) *C. albicans* aderiu mais em *Adesivo Fita* do que nas outras situações; (4) *L. casei* (simples) formou mais biofilme na situação *Sem Adesivo* do que quando adesivos foram utilizados; (5) *C. albicans* (simples e misto) formou mais biofilme quando o *Adesivo Fita* foi utilizado do que quando empregou-se *Adesivo Creme* (6) Na análise qualitativa e na situação *Sem Adesivo*, os dois micro-organismos apresentaram crescimento mais intenso.

Palavras-Chave: Prótese total. Adesivos. Microbiologia.

Oliveira Junior NM de. Influence of the use of denture adhesives on adhesion and biofilm formation single and mixed [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Objectives: To verify whether the adhesives *Ultra Corega Cream* and *Corega Strips* interfere in the adhesion and biofilm formation by *Candida albicans* and *Lactobacillus casei* in single- and mixed-species setup, and observe possible synergistic or antagonistic relationships between these species. **Methodology:** Specimens made from heat-polymerized acrylic resin (*Lucitone 550*) were fabricated (N=144), with circular shape and standardized roughness ($3.0\ \mu\text{m} \pm 0.3$), and were divided into three groups: *Without Adhesive*, with Adhesive *Ultra Corega Cream* and with Adhesive *Corega Strips*. These groups were divided into three subgroups each: *C. albicans* single-species, *L. casei* single-species and *C. albicans* with *L. casei* (mixed-species). Microbial adhesion and biofilm formation assays were performed in duplicate, resulting in 8 specimens (n=8) per experimental condition. The amount of each microorganism on the surfaces of the specimens was observed by counting of Colony Forming Units (CFU) per mL and the specimens were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), being used 18 specimens in this analysis (N=18), 2 per experimental condition (n=2). Analysis of variance by ANOVA two-way and Tukey's test for multiple comparisons were employed, and a significance level of 0.05 was obeyed for all comparisons. **Results:** *L. casei* showed only one difference of adhesion in a situation of its mixed-species cultivation, in which *L. casei* (mixed-species) adhered more in the situation *Without Adhesive* than when *Cream Adhesive* was used, and *C. albicans* (single- and mixed-species) adhered more when *Strips Adhesive* was used. *C. albicans* both single- and mixed-species adhered more than *L. casei* (single- and mixed-species). *L. casei* (single) formed more biofilm in the situation *Without Adhesive*, but in its mixed cultivation with *C. albicans* had no difference of growth in the tested situations. *C. albicans* (single- and mixed-species) formed more biofilm when the *Strips Adhesive* was used in relation to *Cream Adhesive*, and the fungus formed more biofilm when compared to *L. casei*. In general, always that a specie was compared in its single- and mixed-species situation, both in adhesion and biofilm, no statistically significant difference was observed. During the qualitative analysis was observed that, in biofilm formation assays, *L. casei* single-species in the condition *Without Adhesive* had higher growth than when the adhesives tested were used, and *C. albicans* both simple and mixed growth more in the *Strips Adhesive* than in *Cream Adhesive*. **Conclusions:** (1) It was not observed relations of synergism or antagonism between the two microorganisms studied; (2) *L. casei* does not differ its adhesion when adhesives are used; (3) *C. albicans* adhered more in *Strips Adhesive* than in the other situations; (4) *L. casei* (single-species) formed more biofilm in the situation *Without Adhesive* than when adhesives were used; (5) *C. albicans* (single- and mixed-species) formed more biofilm with *Strips Adhesive* than with *Cream Adhesive*; (6) In the qualitative analysis and in the situation *Without Adhesive*, the two microorganisms showed more intense growth.

Keywords: Denture, complete. Adhesives. Microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 PROPOSIÇÃO.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Informações gerais sobre adesivos protéticos.....	17
3.2 Informações gerais sobre estomatite protética.....	22
3.3 Influência de adesivos protéticos especificamente no desenvolvimento de espécies de <i>Candida</i>	25
3.4 Influência de adesivos protéticos na microbiota e células orais.....	29
3.5 Composição da microbiota oral em dentados e usuários de próteses.....	32
3.6 Desenvolvimento de biofilmes multiespécies.....	37
3.7 Uso de probióticos de <i>Lactobacillus</i> spp. no combate à estomatite protética - estudos clínicos.....	39
3.8 Uso de probióticos de <i>Lactobacillus</i> spp. no combate à candidíase urogenital.....	40
3.9 Interações variadas entre <i>Candida</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp.....	41
4 MATERIAL E MÉTODO.....	47
4.1 Material.....	47
4.2 Método.....	51
4.2.1 Confeção de espécimes de resina acrílica.....	51
4.2.1.1 Inclusão dos discos de silicona.....	51
4.2.1.2 Manipulação, prensagem e polimerização da resina acrílica.....	54

4.2.1.3 Desinclusão e acabamento.....	56
4.2.1.4 Padronização da rugosidade superficial.....	57
4.2.1.5 Desinfecção dos espécimes.....	58
4.2.2 Análises Microbiológicas.....	59
4.2.2.1 Preparo dos inóculos.....	60
4.2.2.2 Aplicação dos adesivos.....	61
4.2.2.3 Coleta e preparo da saliva.....	62
4.2.2.4 Ensaios de Adesão.....	64
4.2.2.5 Ensaios de formação de Biofilme.....	66
4.2.2.6 Caracterização dos espécimes por condição experimental através de análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	67
4.3 Análise Estatística.....	69
5 RESULTADOS	70
5.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia.....	70
5.2 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	76
6 DISCUSSÃO.....	88
7 CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICE.....	100
ANEXO.....	101

1 INTRODUÇÃO

A retenção das próteses totais convencionais na cavidade oral é obtida fundamentalmente pela interação de mecanismos físicos⁴⁵ que incluem a adaptação desta sobre os tecidos de suporte com a presença de uma fina camada de saliva entre a base da prótese e a mucosa, uma adequada extensão periférica de suas bordas, e a pressão atmosférica, além de fatores fisiológicos como um controle neuromuscular adequado^{4,19,35,55}. Existem ocasiões em que a retenção da prótese total fica comprometida, mesmo com a realização de procedimentos corretos durante a sua confecção^{45,55}. Nestes casos os pacientes são orientados a fazer uso de adesivos para prótese, que irão auxiliar na sua retenção, estabilidade e função^{13,24,26,31,52,55,74}. Os adesivos para prótese ou fixadores para dentaduras, como são denominados comercialmente, são definidos como materiais utilizados para auxiliar na adesão da prótese na mucosa^{45,74} e são utilizados em situações onde os fatores físicos que promovem sua retenção são limitantes^{46,55}. Basicamente, sua ação ocorre devido à viscosidade do adesivo na interface entre a base da prótese e a mucosa, facilitando o selado periférico por meio de uma melhor adesão³⁷.

Quando indicados corretamente, diversos são os benefícios da utilização desses adesivos, quer na qualidade de vida dos usuários de próteses totais em termos de adaptação, estabilidade, retenção e conforto, por reduzirem significativamente o movimento das próteses totais, como também por proporcionarem maior habilidade para mastigar e falar^{12,14,24-26,31,52,55,65,74}. Os adesivos atuam também como apoio psicológico aos pacientes, promovendo uma maior autoconfiança na sua utilização⁵⁵. Apesar de muitos profissionais hesitarem em recomendar adesivos protéticos abertamente, o uso como meio auxiliar no tratamento de usuários de próteses totais é reconhecido e consagrado na literatura odontológica^{22,23,32,59}.

Os adesivos para próteses podem ser divididos em insolúveis e solúveis. Do grupo insolúvel fazem parte as almofadas adesivas, enquanto o grupo solúvel inclui creme, pó e fita. É comum a inclusão de um ou mais componentes que tornem o adesivo viscoso e pegajoso quando há absorção de água, especialmente nos adesivos do grupo solúvel²³, o que poderia resultar em maior colonização microbiana nas próteses quando há uso destes adesivos. Em geral adesivos protéticos são

compostos por substâncias ativas como goma karaya, tragacanto, acácia, pectina, gelatina, metil-celulose, hidroximetil celulose, carboximetilcelulose de sódio, além de polímeros sintéticos (óxido de polietileno, acrilamidas, polivinil acético^{2,23}), e componentes não-ativos, tais como vaselina e óleo mineral, que são incluídos com o objetivo de facilitar o manuseamento do material^{2,23}. Geralmente também são incluídos óleos de menta e derivados para dar sabor agradável, corantes, e borato de sódio e de metilo ou poli-paraban, que são utilizados como conservantes. Ainda, agentes antimicrobianos tais como hexaclorofeno, tetraborato de sódio, metilsalicilato e borato de sódio⁵⁴ são incorporados por alguns fabricantes na composição de adesivos para próteses.

O efeito de adesivos protéticos sobre a microbiota oral é alvo de alguns estudos presentes na literatura odontológica. Um trabalho de 2013 comprovou a eficácia antimicrobiana de 3 marcas comerciais de adesivos protéticos (*Corega*, *Biotene* e *Fixodent*) em relação às espécies bacterianas *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mutans*, *Prevotella oralis* e *Fusobacterium nucleatum*⁶⁴. Além disso, alguns estudos observaram efeito antifúngico de adesivos protéticos^{36,66,71}. No entanto, outros trabalhos têm mostrado que estes agentes não apresentam um efeito sobre a microbiota oral, principalmente em relação ao crescimento dos fungos do gênero *Candida*^{29,33,50,54}, espécies comumente relacionadas à casos de estomatite em usuários de próteses^{15,16}. Tais discrepâncias nos resultados podem ser atribuídas ao fato de que cada estudo avalia diferentes adesivos, diferentes espécies microbianas e empregam distintas técnicas para ensaio de crescimento microbiano⁷¹. Theilade et al.⁷⁶ afirmaram que estudos relacionados à microbiota oral de pacientes desdentados são fragmentados, frequentemente derivados de uma pequena amostra e/ou pacientes, e se utilizam de técnicas que detectam um pequeno número de micro-organismos. Dessa maneira, não há consenso em relação ao fato de que adesivos para próteses tenham um efeito sobre o crescimento e colonização microbiana^{48,59}.

O estudo do efeito dos adesivos para dentadura na microbiota oral vem a ser um aspecto de interesse pois a dificuldade de remoção dos adesivos da prótese e dos tecidos orais^{14,48}, aliada ao ambiente formado entre a prótese e a mucosa, pode acarretar a proliferação e sobrevivência de micro-organismos orais, sendo estes compostos também por bactérias, mas principalmente por espécies de

*Candida*²¹. Desse modo, a sobrevivência de determinados micro-organismos pode resultar no desenvolvimento de doenças específicas na mucosa oral, como a estomatite protética.

A estomatite protética, infecção fúngica que acomete muitos usuários de próteses totais, apresenta etiologia multifatorial e tem como um grande fator predisponente a má higiene oral^{8,21,70}, apontada como uma das principais contribuintes para a manutenção de *Candida* spp. nesse nicho, e, portanto, influenciando o potencial de virulência desses fungos⁷⁰. Ainda, a resina acrílica utilizada na confecção de próteses totais tem como característica a rugosidade superficial, o que muitas vezes facilita a adesão microbiana e desenvolvimento de biofilme quando existe higiene precária⁸. Entre as estratégias disponíveis para o tratamento da estomatite protética, sem dúvida a instrução aos usuários de próteses totais em relação à higienização^{8,21,70}, assim como a remoção da prótese durante o sono são primordiais, mas o tratamento pode contar ainda com a prescrição de antifúngicos e antissépticos ou desinfetantes⁷⁰. Nota-se na literatura científica atual que o uso de probióticos no combate ao desenvolvimento exacerbado de espécies de *Candida* é também uma realidade como um coadjuvante do tratamento convencional⁴¹. Os probióticos referem-se à cepas selecionadas, sendo estas consideradas suplementos de micro-organismos vivos que tem efeito benéfico no organismo do hospedeiro.

A associação de espécies probióticas, especialmente de *Lactobacillus*, à espécies de *Candida*, tem se tornado alvo de vários estudos atuais que objetivam inibição de desenvolvimento fúngico^{10,27,28,41,43,51,68,72,80}. Por exemplo, o consumo diário de dois queijos experimentais contendo probióticos (*Lactobacillus acidophilus* NCFM ou *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32) foi eficaz na inibição da colonização oral de *Candida* spp. em usuários de próteses totais⁴³. Ainda, as cepas *Lactobacillus rhamnosus* HS111 e *Lactobacillus acidophilus* HS101 foram espécies probióticas efetivas no tratamento de candidíase de usuários de próteses totais²⁷. Não somente na área odontológica, mas também no campo da ginecologia^{42,47,82} há interesse no assunto, uma vez que a colonização descontrolada de espécies de *Candida* é a grande responsável também por infecções ginecológicas. Em outro estudo que preconizou o consumo diário de espécies probióticas de *Lactobacillus* por via oral, o tratamento antimicrobiano proposto foi eficaz contra infecções uro-genitais por

Escherichia coli e *Candida albicans*⁴², mostrando-se assim um coadjuvante promissor no tratamento de pacientes nessa situação. Köhler et al.³⁰, por sua vez, observaram em um estudo in vitro que o desenvolvimento de *Candida albicans* foi reduzido devido à produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus reuteri* RC-14. No entanto, estudos que empregam espécies patogênicas de *Lactobacillus* no tratamento de infecções por *Candida* são escassos^{3,6,49}.

Um estudo recente comparou os microbiomas de usuários de próteses totais, buscando compreender as relações patógeno-hospedeiro e as interações entre as diferentes espécies microbianas encontradas no ambiente oral⁴⁹. A composição bacteriana de amostras coletadas de 123 participantes foi determinada por sequenciamento da região bacteriana hipervariável V4 de genes 16S *rDNA*, além da composição fúngica, através de cultura de espécies de *Candida*⁴⁹. Os pesquisadores encontraram correlação entre espécies de *Candida* e *Lactobacillus* patogênico, sendo esta uma evidência de que o desenvolvimento da estomatite protética é mais complexo do que uma simples infecção fúngica. Segundo esses autores, tanto fungos quanto bactérias têm um papel evidente na progressão da estomatite protética.

Em um estudo de 2009, evidências de que espécies de *Candida* e de *Lactobacillus* patogênico estão conjuntamente envolvidas no desenvolvimento da estomatite protética também são apresentadas. Bilhan et al.⁶ concluíram que espécies de *Lactobacillus* parecem desempenhar um importante papel no desenvolvimento de estomatite protética, no entanto sugerem que essa associação seja mais profundamente investigada. Já em uma publicação de 2016, Allison et al.³, ao explorarem a literatura atual relacionada à *Candida* spp. e bactérias clinicamente importantes, mencionam que *Lactobacillus* spp. patogênicos isolados da cavidade oral tem a capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans* através da produção de peróxido de hidrogênio. Os autores comentam que a interação destas espécies acontece também no aparelho genital feminino, onde *Lactobacillus* spp. agem como barreira contra infecção de outros patógenos pela competição por adesão e produção de componentes antimicrobianos, como peróxido de hidrogênio. Desta maneira, os autores indicam que os dados da literatura sugerem efeito inibitório de

Lactobacillus sobre desenvolvimento de *Candida*, formação de hifas e produção de biofilme.

Uma maior exploração na inter-relação entre *Candida spp.* e *Lactobacillus spp.* mostra-se necessária para fornecer maiores evidências sobre o assunto, uma vez que há comprovação que *Lactobacillus* estão presentes no ambiente oral, na saliva^{17,40,81}, e em lesões de cárie¹, havendo inclusive aumento no número de *Lactobacillus* orais em saliva com o aumento da idade⁴⁰. A identificação e quantificação de tais espécies, buscando uma relação de sinergismo ou antagonismo entre elas, auxilia na compreensão da função de tais micro-organismos no desenvolvimento da estomatite protética, permitindo determinar o papel dos *Lactobacillus* (inibitório, contribuinte ou neutro). Nesse contexto, a consequência do uso de adesivos protéticos com diferentes formas físicas de apresentação sobre o desenvolvimento microbiano de maneira isolada e multiespécies pode ajudar a esclarecer se estes materiais influenciam neste processo. O entendimento destas interações é importante não somente para uma melhor compreensão da patobiologia de infecções e interações microbianas, mas também para a formulação de novas estratégias e composição de agentes antimicrobianos que possam combater tais infecções, especialmente em adesivos utilizados em reabilitações protéticas.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Verificar se os adesivos *Ultra Corega Creme* e *Corega Fita Adesiva* interferem na adesão e formação de biofilme simples e misto;
2. Observar possíveis relações de sinergismo ou antagonismo entre as espécies de *Candida albicans* e *Lactobacillus casei*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A seguir são citados estudos relevantes e que serviram como base de conhecimento para o desenvolvimento da pesquisa. Por fins didáticos, este capítulo encontra-se dividido em 9 diferentes temas.

3.1 Informações gerais sobre adesivos protéticos

Em uma revisão de literatura de 1996, Grasso²² descreveu o mecanismo de ação de adesivos para próteses usados na época, os quais dependiam da combinação de forças físicas e químicas. A força necessária para separar duas placas é diretamente proporcional à viscosidade do líquido existente entre elas. Desse modo, quando a saliva atua, há também aumento na força necessária para separar a prótese da superfície da mucosa oral. Adesivos para próteses aumentam essa força pelo uso de materiais que fornecem resistentes enlaces coesivos e bioadesivos. A maioria dos adesivos se utilizam de compostos que oferecem bioadesão através de grupos carboxílicos, os quais formam uma adesão eletrovalente que produz viscosidade. Um exemplo disso é o componente Polimetil vinil éter-anidrido maleico (PVM-MA), copolímero sintético com altos níveis de grupos carboxílicos, assim como a Carboximetilcelulose de Sódio (CMC), que tem ação semelhante. O autor comenta que apesar de suas propriedades, o uso dos adesivos é limitado devido à falta de conhecimento por parte dos profissionais, e devido a opiniões negativas que podem ser reflexo da falta de experiência clínica. Exceto pela contra-indicação de uso em próteses mal adaptadas, não houve argumentos justificáveis contra o uso de adesivos, sendo eles um bom recurso quando utilizados corretamente. Concluiu-se que os adesivos podem ter seu uso difundido, considerando que há pesquisas comprovando sua eficácia na melhora da função, retenção, estabilidade, força de mordida incisal e sensação de conforto físico e psicológico ao paciente.

No ano 2000, Coates¹⁴ pesquisou a incidência de uso de adesivos para próteses em uma população desdentada a fim de determinar o índice de sucesso e as razões que levavam à utilização ou não desse adjunto ao tratamento reabilitador.

Cento e quarenta e seis pacientes desdentados de um Hospital Odontológico do sul da Austrália foram questionados sobre o uso de adesivos para próteses. O grupo pesquisado foi dividido em três categorias: indivíduos que nunca tinham usado adesivos, aqueles que já tinham utilizado por um breve período e aqueles que usavam adesivos protéticos atualmente. Dos participantes, 35,6% eram do sexo masculino, 64,4% eram do sexo feminino, e 65,7% tinham mais de 60 anos de idade. 54,9% dos participantes eram usuários de próteses totais há 10 anos ou mais e 17,8% há 20 anos ou mais. Um total de 67,1% dos indivíduos nunca havia usado adesivo para próteses, 32,9% já tinham utilizado em algum momento, e apenas 6,9% eram usuários atualmente. Várias razões foram dadas em relação às experiências de uso de adesivos, tanto para aqueles que usavam continuamente ou nunca usavam quanto para aqueles que tentaram utilizar em algum momento. As principais razões dadas pelos participantes que nunca utilizaram adesivos foram a ausência de necessidade, pois consideravam suas próteses bem adaptadas (52% do total de participantes), e o desconhecimento da existência de adesivos (20,5% do total). Para aqueles que já haviam utilizado, as principais razões relatadas foram tentativa de melhorar a adaptação, o conforto e sua capacidade mastigatória. Ainda, segundo o estudo, apenas 6,9% dos indivíduos que experimentaram o uso de adesivos continuaram a utiliza-los periodicamente.

Grasso²³ (2004), em uma revisão da literatura, menciona que os adesivos para próteses podem ser divididos em insolúveis e solúveis, os quais variam em sua composição. Fazem parte do grupo insolúvel a forma física de almofadas adesivas e pastilhas sintéticas, enquanto no grupo solúvel estão incluídos creme, pasta e pó. Antigamente, o grupo solúvel apresentava agentes sintéticos que dependiam essencialmente das propriedades químicas de um ou mais ingredientes ativos que incrementavam seu volume, tornando os adesivos viscosos e pegajosos na presença de água ou saliva. Foi relatado que em presença de água aumentavam seu volume de 50% a 150%, preenchendo os espaços existentes entre a base da prótese e os tecidos de suporte. Atualmente, os ingredientes ativos são uma mistura de sais de polímeros com diferentes graus de solubilidade em água, desenvolvidos para produzir adesivos de ação a curto ou longo prazo. A CMC e o PVM-MA são exemplos de sais de curta e longa duração, respectivamente. Os sais CMC

fornece uma forte retenção inicial, no entanto devido a seu alto grau de solubilidade dissolvem-se rapidamente, perdendo sua efetividade em um curto período de tempo. Já os sais de PVM-MA apresentam uma baixa solubilidade que tarda seu processo de ativação, mas apresentam-se ativos por um período maior. O grupo de adesivos insolúveis, por sua vez, basicamente são compostos por um tecido laminado ativado por umidade e que se torna pegajoso ao entrar em contato com a saliva do paciente, sendo exemplos desses agentes adesivos o alginato de sódio e o polímero óxido etileno. O autor também menciona na revisão a importância do conhecimento relacionado a adesivos para próteses por parte do clínico, permitindo desse modo a transmissão do conhecimento para o paciente, além de listar alguns mitos relacionados ao uso de adesivos, como a ideia de que adesivos para próteses não podem desempenhar um papel benéfico em próteses bem adaptadas. Por fim, o autor destaca o risco do uso de adesivos em próteses mal adaptadas, que pode levar a traumatismos ou consequências mais sérias como neoplasias, e comenta a importância do acompanhamento profissional quando do uso a longo prazo de adesivos protéticos.

Fakhri et al.¹⁸ (2009) enviaram um questionário a 300 cirurgiões-dentistas clínicos gerais de Tehran (Iran) com o objetivo de avaliar o nível de conhecimento e as atitudes dos profissionais em relação ao uso de adesivos para próteses. Após análise dos resultados, foi observado que 14%, 32% e 37% dos clínicos apresentaram, respectivamente, bom, moderado, e baixo conhecimento em relação ao material, enquanto 16% o desconheciam. Uma relação significativa entre o grau de conhecimento sobre o material e a experiência clínica foi observada. Constatou-se ainda que mais de 50% dos dentistas não possuíam conhecimento profundo em relação a este material. Em relação à opinião dos dentistas com bom e moderado conhecimento sobre adesivos, 9% tinham experiências positivas com o material, 71% tinham experiências razoáveis e 19% tinham experiências negativas frente ao uso dos adesivos para próteses. Mais de 65% dos participantes do estudo concordaram com a afirmação de que adesivos podem levar ao desenvolvimento de estomatites protéticas, gerando instabilidade na microflora oral por contaminação microbiana. Além disso, 65% concordaram que o uso de adesivos poderia ser útil para fornecer alívio psicológico aos pacientes, mas também para mascarar

problemas nas próteses. Os autores concluíram que o nível de conhecimento do grupo de cirurgiões-dentistas pesquisados em relação ao uso de adesivos para próteses não era satisfatório. Ainda, comentaram que somente através da educação, tanto de clínicos quanto de pacientes, seria possível maximizar os benefícios do uso de adesivos protéticos e minimizar seu uso indevido.

Polyzois e de Baat⁶³ (2012) realizaram um estudo em dois países com o objetivo de verificar se haviam diferenças no uso e nas atitudes relacionadas ao uso de adesivos para próteses. O levantamento ocorreu na Grécia e na Holanda com amostras compostas por 284 e 165 portadores de próteses totais, respectivamente, por meio da aplicação de um questionário. Os resultados mostraram que 26% dos gregos e 20% dos holandeses já tinham utilizado adesivos para próteses, mas apenas 27% destes, tanto na Grécia como na Holanda, ainda faziam seu uso. 49% dos gregos e 45% dos holandeses avaliaram o desempenho geral dos adesivos como “bom”. Não foram identificadas variáveis de pesquisa com resultados discrepantes entre as populações estudadas, exceto pelo fato de que 27% dos gregos afirmaram que desconheciam adesivos para próteses, enquanto nenhum indivíduo na Holanda relatou desconhecer. 90% dos holandeses e 70% dos gregos afirmaram que não precisavam de adesivos pois suas próteses tinham bom desempenho. Concluiu-se que o uso e as atitudes frente a adesivos protéticos entre as amostras gregas e holandesas, de um modo geral, foram similares.

Papadiochou et al.⁵⁹, em uma revisão de 2015, buscaram esclarecer alguns aspectos relacionados aos adesivos protéticos, como efetividade e biocompatibilidade, assim como atitudes de profissionais e pacientes com esse material. Os autores encontraram evidências de que os adesivos aumentam, de um modo geral, o desempenho de próteses totais, tais como estabilidade, retenção e desempenho mastigatório. Ressaltam que estudos analisando a biocompatibilidade de adesivos são escassos, havendo poucos estudos in vivo. A maioria destes investiga a toxicidade e potenciais contaminações microbianas neste material, especialmente em relação ao desenvolvimento de *C. albicans* e *Streptococcus* na mucosa oral de usuários de próteses após uso prolongado de adesivos, não havendo evidências de que estes promovem alteração da comunidade microbiana.

Ainda, os autores destacam que os usuários deste produto de um modo geral têm uma opinião positiva em relação a ele, o que é um reflexo da incidência de uso. No entanto, destacam também que educadores da área de odontologia e muitos cirurgiões-dentistas hesitam em recomendar adesivos protéticos abertamente.

O uso de adesivos para próteses é comum entre usuários de próteses totais, sendo este produto prescrito por muitos cirurgiões-dentistas. Por este motivo, Kumar et al.³², no ano de 2015, também publicaram uma revisão sobre este assunto. Os autores explicam que os principais ingredientes de adesivos protéticos podem ser classificados em três grupos, sendo eles: (1) agentes adesivos, (2) agentes antimicrobianos, e (3) outros agentes, tais como plastificantes, aromas e agentes umidificantes. Os autores também exploram o modo de ação dos adesivos, destacando que como os adesivos na forma de pó absorvem água, estes aumentam muito seu volume original, e os ânions formados desta maneira interagem com cátions das proteínas na membrana mucosa oral. A viscosidade do adesivo é aumentada ao ter contato com saliva, contribuindo desta maneira no aumento da retenção das próteses. Além disso, os adesivos mais recentes geram resistência bioadesiva e forças coesivas. Grupos carboxílicos livres formados pela hidratação do adesivo, tais como metil-celulose, metil-celulose hidroxil, celulose carboxi-metil de sódio ou polimetil vinil éter maleico anidro, entre outros compostos, formam ligações eletrovalentes que produzem bio-adesão e viscosidade. Também são citados no trabalho os requisitos ideais de um adesivo para próteses, modo de aplicação, indicações e contra-indicações, sendo portanto um artigo de revisão informativo importante da atualidade, que finaliza defendendo o uso de adesivos como meio auxiliar no tratamento de indivíduos usuários de próteses totais, desde que seu uso seja acompanhado por um profissional.

Bogucki et al.⁷, ainda em 2015, analisaram a opinião de indivíduos com xerostomia em relação à efetividade de adesivos para próteses. Sessenta pacientes xerostômicos e usuários de próteses totais com retenção e estabilidade protética reduzidas participaram desta pesquisa, sendo estas características determinadas através de exame clínico e teste padrão de sialometria. A retenção das próteses maxilares foi mensurada também através do Índice de Kapur modificado, feito antes

da aplicação dos adesivos. Todos os participantes foram aleatoriamente divididos em 6 grupos, sendo cada grupo orientado a utilizar um diferente adesivo durante o período observacional de 6 meses. Os seis adesivos testados foram: *Secure (Johnson&Johnson)*, na forma de fita adesiva; *Protefix (Queisser Pharma)*, na forma de fita adesiva; *Protefix (Queisser Pharma)*, na forma de pó; *Fitty-dent (Fittydent International)*, na forma de cola adesiva; *Blend-a-dent (Wick Pharma)*, na forma de cola adesiva; *Corega Fix&Fest (Block Drug Comp. Inc)*, na forma de creme. Após esse período, os participantes responderam a um questionário sobre sua qualidade de vida durante o uso dos adesivos. Os adesivos aumentaram consideravelmente a retenção e estabilidade das próteses totais maxilares, além de prover maior conforto psicológico, segundo a percepção dos participantes. Os adesivos na forma física de creme resultaram em maior efetividade retentiva nos indivíduos com xerostomia, no entanto estes materiais se mostraram de difícil remoção da base protética. Desta forma, os autores concluíram que os adesivos protéticos, de uma maneira geral, serviram como meio auxiliar no uso de próteses por pacientes xerostômicos, no entanto sempre que possível deve ser feito o tratamento das causas e sintomas da xerostomia.

3.2 Informações gerais sobre estomatite protética

Em um artigo de revisão do ano 2000, Budtz-Jørgensen⁸ explica que a instalação de uma prótese na cavidade oral resulta em profundas alterações nas condições locais, devido ao fato de que prótese e mucosa podem vir a serem colonizadas por microrganismos, incluindo espécies de *Candida*. Isto pode resultar na estomatite protética, uma reação inflamatória não específica contra antígenos antimicrobianos, toxinas e enzimas produzidas pelos microrganismos colonizadores. A colonização de superfícies protéticas por *Candida* depende de alguns fatores, incluindo a aderência de células de levedura, interação com as bactérias orais e as propriedades de superfície da resina acrílica. A patogenicidade da placa presente nas próteses pode ser aumentada por fatores que estimulem a produção de leveduras, como má higiene oral, grande ingestão de carboidratos, fluxo salivar diminuído e uso contínuo das próteses. Os fatores mais importantes que podem modular o relacionamento parasita-hospedeiro e aumentar a susceptibilidade de

estomatite protética são a idade, má alimentação, imunossupressão, terapias com radiação e *diabetes mellitus*. Medidas adequadas de higiene oral e das próteses são fundamentais para manter condições orais saudáveis. Apesar de a infecção por *Candida* ser uma condição relativamente inofensiva em indivíduos saudáveis, os autores destacam que o conjunto de fatores predisponentes podem tornar estes indivíduos susceptíveis.

Chandra et al.¹¹, em uma publicação de 2008, explicam que a análise de formação de biofilme fúngico pode ser feita por diferentes técnicas, e descrevem métodos usados para a formação de biofilmes de *Candida*. Os autores destacam que a formação de biofilmes envolve a fase de adesão das células fúngicas a um substrato pré-tratado, seguido pelo desenvolvimento em um meio. Os biofilmes formados são quantificados pela determinação de sua atividade metabólica e peso seco, enquanto que sua morfologia e arquitetura podem ser analisadas por microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura ou técnicas de microscopia por escaneamento confocal a laser.

Em um artigo de caráter informativo de 2011, Salerno et al.⁷⁰ discorrem sobre a estomatite protética associada à *Candida*. A espécie *C. albicans* é uma levedura dimórfica gram-positiva capaz de viver como organismo comensal normal na cavidade oral de indivíduos saudáveis. No entanto, sob fatores locais e sistêmicos relacionados às condições do hospedeiro, torna-se virulento e responsável pela doença conhecida como candidíase oral. Estudos clínicos comprovaram que a *C. albicans* é apta a aderir não somente em superfícies mucosas, mas também à resinas acrílicas de próteses dentárias. Hábitos ruins de higiene oral mostram-se como os principais responsáveis para a virulência de *Candida*, sendo o tratamento para estes casos baseado em uso tópico ou sistêmico de antifúngicos principalmente, mas também muitas vezes acompanhado de antissépticos e desinfetantes. Os autores explicam que a capacidade da *Candida* de passar através dos tecidos (adesão) constitui-se o primeiro passo do processo infeccioso. Formas dotadas de hifas são capazes de aderir e invadir o tecido do hospedeiro ainda mais rapidamente. O complexo mecanismo de interação entre a *Candida* e o hospedeiro envolve o ligamento entre ligantes celulares de *Candida* e

receptores celulares do hospedeiro. As leveduras produzem material polimérico extracelular contendo manoproteínas, e a interação com células epiteliais acontece entre estas manoproteínas e a fucose ou a acetilglucosamina presente na superfície proteica de células epiteliais. Em relação à permeabilidade em resinas acrílicas, comentam que, inicialmente, a adesão de *Candida* depende das microporosidades presentes na superfície protética. Tais irregularidades na superfície possibilitam a instalação de cepas e dificultam a eliminação de bactérias por ação mecânica e até mesmo por procedimentos químicos. Desta maneira, em presença de higiene oral precária, a *Candida* pode penetrar, aderir e inclusive interagir com comunidades bacterianas, tais como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus anginosus* (*S. milleri*), através de interações entre proteínas e carboidratos.

Zomorodian et al.⁸⁴, também em 2011, analisaram a prevalência de estomatite protética em portadores de próteses totais e sua associação, particularmente, com espécies de *Candida*, e observou os fatores de risco envolvidos ao desenvolvimento de estomatite protética. A pesquisa contou com 114 participantes, dos quais amostras foram coletadas da mucosa oral ou das lesões (quando estas estavam presentes), e das próteses. Análise morfológica foi utilizada para identificar culturas positivas para leveduras, e estas foram diferenciadas de acordo com suas propriedades fisiológicas, tais como capacidade de produzir *chlamydoconidia* e formação de cor em meio *Chromagar*. Além disso, o DNA genômico foi extraído e purificado, e as espécies de *Candida* foram identificadas pela amplificação das regiões do gene *rRNA ITS1-5.8S-ITS2*, e produtos de PCR amplificado digeridos com *Msp* I. *Candida dubliniensis* foi diferenciada de *Candida albicans* por digestões adicionais com *Bln* I. Em alguns casos onde houve dificuldade de identificação das espécies, análise adicional com o sistema *RapID plus* e sequenciamento da região *ITS* foram utilizados. *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente encontrada (41,5%), seguida por *Candida glabrata* (18,4%), e *Candida tropicalis* (12,9%). Ainda, os autores relatam que foi encontrada uma taxa de 10,9% de *Candida dubliniensis*, e que esta foi a primeira identificação de tais espécies em amostras clínicas em seu país (Iran). Os autores mencionam também

que uma associação significativa foi estabelecida entre a frequência do uso de próteses totais e candidíase oral.

Gendreau et al.²¹, ainda em 2011, publicaram um artigo de revisão que fornece uma atualização sobre a etiologia e epidemiologia da estomatite protética e a influência potencial dos materiais utilizados na confecção de próteses totais neste contexto. A doença tem etiologia multifatorial, e os fatores predisponentes que estão fortemente associados são higienização oral precária, má adaptação e colonização da superfície protética e da mucosa oral, principalmente da mucosa que fica em contato com as superfícies protéticas. A má higienização acarreta rápida formação de biofilme e acúmulo e placa. Considerando que isto fornece os meios ideais para a colonização protética por cepas de *Candida*, a correlação entre higiene precária e propensão à candidíase é clara. Os materiais utilizados na confecção de próteses dentárias podem contribuir também para o desencadeamento de estomatite protética, visto que a rugosidade superficial e a hidrofobicidade destes podem facilitar a adesão de micro-organismos e desenvolvimento de biofilme. Próteses de boa qualidade, aliadas a adequadas práticas de higiene oral diárias e orientações referentes à importância do acompanhamento por profissional capacitado são chaves para o sucesso do tratamento e manutenção das próteses. Em casos de estomatite protética, rigorosa limpeza ou até mesmo a troca das próteses deve ser preconizada, juntamente com terapia antifúngica adequada.

3.3 Influência de adesivos protéticos especificamente no desenvolvimento de espécies de *Candida*

Makihira et al.³⁶, em 2001, investigaram o desenvolvimento de espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. tropicalis*) em diferentes marcas comerciais de adesivos protéticos. Baseados em um estudo anterior, os autores consideraram uma correlação entre o valor de pH do meio e o grau de desenvolvimento fúngico, de modo que o valor do pH diminui quando há desenvolvimento fúngico. Assim, os autores monitoraram mudanças de pH em meios de crescimento in vitro, com o objetivo de detectar possível desenvolvimento das espécies de *Candida* investigadas. Seis marcas comerciais de adesivos e uma de resina acrílica (controle)

foram testadas: *Cushion Collect* (Shionogi), *Collect Soft A* (Shionogi), *Liodent* (Lion), *Liodent Pink* (Lion), *Tafu Grip* (Kobayashi), *Tafu Grip Hadairo* (Kobayashi), além da resina *Bio Resin* (Shofu). O efeito de cada produto no valor de pH do meio foi examinado, e pôde-se observar que os produtos *Cushion Collect* e *Collect Soft A* diminuíram significativamente o desenvolvimento de *C. albicans*, enquanto o adesivo *Collect Soft A* também reduziu o desenvolvimento de *C. tropicalis*.

Kim et al.²⁹, no ano de 2003, avaliaram o efeito do adesivo *Poly Grip Free creme* na quantidade de espécies de *Candida* encontradas na cavidade oral de indivíduos usuários de próteses totais. Amostras foram coletadas da saliva e das próteses maxilares de 12 indivíduos. Nos 14 primeiros dias experimentais, os participantes foram orientados a utilizar suas próteses totais sem adesivo protético. A partir do décimo quarto dia, os participantes foram orientados a utilizar o adesivo nas próteses maxilares 2 vezes ao dia durante 14 dias, totalizando 28 dias de acompanhamento experimental. Tripticase 26noc de soja (TSA), um meio não-seletivo para a contagem total viável de espécies de *Candida* foi utilizado. Não foi observada diferença na quantidade total de *Candida* encontrada após o período controle e após período de uso do adesivo protético, tanto nas amostras de saliva quanto nas amostras recolhidas das próteses, sugerindo que o adesivo estudado não influenciou a quantidade oral de espécies de *Candida* em usuários de próteses totais.

Oliveira et al.⁵⁰, em 2010, analisaram o efeito de um adesivo para próteses na quantidade de espécies de *Candida*, através da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL de saliva. Amostras de saliva foram coletadas de 24 indivíduos, sendo que 12 utilizaram próteses totais sem adesivos e 12 utilizaram o adesivo *Corega Fita*, durante o período de 14 dias. As amostras foram coletadas no início do período experimental (controle), após 7 e 14 dias. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, sugerindo que o adesivo protético não alterou significativamente a quantidade de espécies de *Candida* na saliva de indivíduos totalmente desdentados, durante o período estudado.

Sampaio-Maia et al.⁷¹, em 2012, analisaram in vitro o efeito de adesivos protéticos no crescimento de *C. albicans*. Foram testadas os adesivos *Corega* creme, *Kukident* creme, *Novafix* creme, *Polident* creme, *Protefix* creme, *Steradent* creme, *Aderyn* pó, *Ultra Corega* pó, *Protefix* pó e *Corega* fita. Curvas de crescimento de *C. albicans* foram obtidas na presença ou ausência de 1% de solução do adesivo protético diluído em caldo *Sabouraud*. Mudanças morfológicas micro e macroscópicas em *Candida albicans* foram analisadas. A maioria dos adesivos protéticos estudados induziram mudanças morfológicas em células e colônias *C. albicans*, mas apenas dois tiveram algum efeito inibitório significativo no crescimento das leveduras. *Kukident* creme inibiu o crescimento de *C. albicans* de maneira dependente de sua concentração, reduzindo a taxa de crescimento em 95%, enquanto o *Corega* creme também inibiu o crescimento de *C. albicans* porém de modo não-dependente de sua concentração, reduzindo a taxa de crescimento em 37%. Ainda, como informação complementar do estudo, observou-se que adesivos protéticos na forma física de pó apresentaram contaminação microbiana visualmente perceptível.

Bates et al.⁵, em 2016, lideraram um estudo com o objetivo de determinar a atividade de peptídios antimicrobianos (AMPs) e antibióticos antifúngicos em géis com e sem 1% de adesivo para próteses, contra as cepas de *C. albicans* ATCC 64124 e HMV4C. Os autores consideraram a hipótese de que AMPs e antibióticos antifúngicos diminuem suas atividades *anti-Candida* em adesivos protéticos. Para isso, nove AMPs e cinco antibióticos antifúngicos com e sem 1% de adesivo protético foram incubados com as cepas de *C. albicans* em ensaios de difusão radial. Os autores observaram que o adesivo protético pode inativar mediadores imunes natos da cavidade oral, aumentando o risco de infecções por *C. albicans*, mas a inclusão de antibióticos antifúngicos ao adesivo pode auxiliar na prevenção ou tratamento de estomatite protética.

Garaicoa et al.²⁰, em 2016, avaliaram a atividade de agentes anti-*Candida* em um adesivo para prótese e as citotoxicidades destes produtos para queratinócitos primários do epitélio gengival humano. As atividades anti-*Candida* de peptídios antimicrobianos, lipídios antimicrobianos e agentes antifúngicos contra *C.*

albicans ATCC 64124 ou HMV4C foram aferidas em ensaios de microdiluição contendo água ou 1% de adesivo para prótese (o adesivo usado foi *Polygrip*, GSK). As concentrações inibitórias mínimas e as concentrações bactericidas mínimas foram determinadas, além da citotoxicidade dos componentes do adesivo. Lactoferricina B, SMAP 28, esfingosina, dihidroesfingosina, e fitoesfingosina no adesivo a 1% perderam a atividade contra *C. albicans*. Anfotericina B, dihidrocloride de clorexidina, gluconato de clorexidina, fluconazol e nistatina não perderam a atividade antimicrobiana. Os componentes da formulação não se mostraram citotóxicos em relação aos queratinócitos estudados. Peptídios e lipídios antimicrobianos tiveram atividade reduzida em adesivo a 1%, sugerindo que os componentes podem inativar fatores inatos imunes locais na cavidade oral, possivelmente predispondo os usuários de adesivos para próteses a infecções por espécies de *Candida*. Agentes antifúngicos preservaram suas atividades anti-*C. albicans*, sugerindo seriamente que estes agentes podem ser candidatos para inclusão em formulações de adesivos e utilizados como tratamento tópico para indivíduos com estomatite protética.

Rajaram et al.⁶⁶, em 2017, compararam a influência de 3 diferentes formas (pó, creme e fita) de um adesivo protético (*Secure*, *Bioforce*, USA) no desenvolvimento de espécies de *Candida* pelo monitoramento de pH e contagem de colônias em meio de cultura em diferentes períodos de incubação. Um total de 160 espécimes de resina acrílica com dimensões padronizadas foram feitos e divididos em 4 grupos de 40 espécimes cada. O primeiro grupo de 40 espécimes foi usado como controle, onde não foram utilizados adesivos, já nos grupos remanescentes adesivos foram utilizados. Após a adição de cepas padronizadas de *Candida*, 10 espécimes de cada grupo foram então incubados pelos períodos de 6, 24, 48 e 120 horas. O pH e o número de colônias no meio eram verificados para cada espécime em seu período específico de incubação. Os autores concluíram que todas as formas de adesivos protéticos testadas apresentaram efeito antifúngico, e que este efeito foi prolongado no adesivo em forma de fita.

3.4 Influência de adesivos protéticos na microbiota e células orais

Em um estudo antigo de 1971, Stafford e Russell⁷³ investigaram, juntamente com análises da função mastigatória, a composição microbiológica de indivíduos desdentados totais que utilizaram 6 tipos diferentes de adesivos em suas próteses totais. Meios de cultura eram inoculados e incubados por 48 horas, e efeitos inibitórios eram examinados. Os adesivos testados demonstraram crescimento de *S. mitis* e *C. albicans* (com presença de hifas), mas não houve desenvolvimento de *N. pharyngis*. Neste estudo, o uso de adesivos não mostrou efeito inibitório na flora oral. Apesar dos adesivos para próteses já terem sofrido mudanças em relação à composição e atualmente haverem técnicas modernas de identificação microbiana, tal estudo representa o quão antiga é a investigação sobre desenvolvimento microbiano quando adesivos para próteses são utilizados.

Ozkan et al.⁵⁴, em 2012, investigaram a influência de um adesivo para próteses na microbiota oral de usuários de próteses totais. Quinze indivíduos utilizaram *Kukident* (Procter&Gamble Co.) durante um período de 2 meses, enquanto outros quinze não fizeram uso de adesivo. Foram feitas coletas da região do palato, da base protética e da saliva dos participantes. *C. albicans*, *Candida krusei*, *C. glabrata*, *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *a-haemolytic streptococci*, *b-haemolytic streptococci*, *Pneumococcus aureus*, *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, e leveduras foram investigadas, no entanto apenas *a-haemolytic streptococci* e *C. albicans* foram encontrados nas amostras. Embora algum aumento destes microrganismos tenha sido observado nos pacientes que utilizaram adesivo, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo experimental. A quantidade de microrganismos também não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Ainda, observou-se que o uso prolongado de adesivo além do período estipulado de 2 meses não resultou em aumento dos microrganismos da flora oral.

No ano de 2013, Polyzois et al.⁶⁴ investigaram a eficácia antimicrobiana de três adesivos protéticos (*Ultra Corega*, *Fixodent Pro Original* e *Biotene Denture*

Grip) em relação a *Streptococcus oralis* e *mutans*, *Prevotella oralis* e *Fusobacterium Nucleatum* (microrganismos relacionados à mau odor). Para *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mutans*, quatro tubos de 10 mL de *Caldo de Soja Trypticase* e 1 g de adesivo protético foram utilizados, além de quatro tubos de *Caldo de Soja Trypticase* sem nenhum adesivo, que foi utilizado como controle. Para *P. oralis* e *F. nucleatum*, quatro tubos de 10 mL de tioglicolato e 1 g de adesivo foram utilizados para cada, enquanto quatro tubos de 10 mL de tioglicolato sem adesivo foram utilizados como controle. Todas as amostras foram encubadas a 37°C por 48 horas, e após esse período o número de colônias foi quantificado e a média foi extraída em CFU/mL. *S. oralis*, *mutans*, *P. oralis* e *F. nucleatum* apresentaram diminuição no número de colônias para cada adesivo quando comparados ao controle. De acordo com as condições deste estudo in vitro, todos os adesivos testados mostraram eficácia antimicrobiana. No entanto, foi encontrada diferença entre os adesivos testados. *Ultra Corega* e *Biotene Denture Grip* apresentaram maior efeito antimicrobiano para os microrganismos testados em relação à marca *Fixodent Pro Original*.

Leite et al.³³, em 2014, avaliaram a influência do uso do adesivo *Ultra Corega Creme* na formação de biofilme na superfície interna de próteses totais e na mucosa palatina de usuários desta modalidade reabilitadora. Trinta participantes foram submetidos a um delineamento experimental randomizado cruzado, onde utilizaram o adesivo por 15 dias. Alíquotas foram semeadas em *placas de Petri* contendo meio seletivo para *Candida spp*, *S. mutans* e um meio de cultura não seletivo. Além disso, as superfícies internas das próteses maxilares e mandibulares foram coradas e fotografadas com o objetivo de analisar visualmente a quantidade de biofilme presente. Encontrou-se que o uso do adesivo não alterou a contagem de colônias de microrganismos das regiões estudadas, mas a análise das fotografias mostrou que houve aumento da área coberta por biofilme nas superfícies internas das próteses totais após uso do adesivo protético estudado.

Nunes et al.⁴⁸, em 2016, investigaram a efetividade de diferentes protocolos de limpeza para a remoção de adesivos protéticos, e sua influência na microbiota oral. Participantes usuários de próteses totais bem adaptadas foram instruídos a utilizarem um adesivo protético 3 vezes por dia durante um período de 4

semanas, sendo este período dividido em 4 fases: (A) Controle - escovação das próteses com água à temperatura ambiente três vezes por dia, (B) escovação das próteses com água à temperatura ambiente mais sabão de coco três vezes por dia, (C) escovação das próteses com água à temperatura ambiente mais dentífrico três vezes por dia, (D) escovação das próteses com água à temperatura ambiente mais imersão em solução de perborato de sódio por 5 minutos antes do sono noturno. Após cada período de uma semana, amostras de saliva eram coletadas. Um corante foi utilizado para revelar e quantificar o adesivo remanescente na superfície interna das próteses totais, sendo calculadas como porcentagem. Para as análises microbiológicas, a saliva era diluída e regada em *placas de petri* contendo um meio de cultura não seletivo e um meio de cultura para espécies de *Candida*. Após o período de incubação, as espécies de *Candida* foram identificadas e o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) foi calculado. Os autores observaram que a escovação das próteses com sabão de coco, dentífrico ou água combinada à imersão em perborato de sódio se mostraram métodos mais eficazes na remoção do adesivo remanescente do que a quando foi feita escovação com água apenas. Ainda, os métodos de limpeza não influenciaram na quantificação dos micro-organismos de uma maneira geral.

Perin Leite et al.⁶¹, em 2017, avaliaram as citocinas pró-inflamatórias interleucinas (IL) 1 β , IL-6, e fator de necrose tumoral α (TNF- α) liberados de queratinócitos orais humanos após exposição à adesivos protéticos. Eluatos de *Ultra Corega* creme, *Ultra Corega* pó fixador e *Corega* tiras adesivas foram criados após 24 horas de exposição em um meio de cultura. A liberação de IL-1 β , IL-6, e TNF- α foi mensurada através de um ensaio imunoenzimático após as células epiteliais (NOK-SI) serem expostas aos eluatos por 3, 6 e 24 horas. A liberação de IL-1 β do adesivo em forma de fita foi maior no período avaliado de 3 horas quando comparado ao controle; as liberações de IL-6 do adesivo em forma de creme e pó nos períodos de 6 e 24 horas foram maiores que os controles; a liberação de TNF- α não foi detectável em alguns grupos e períodos. Os autores puderam concluir que em longos períodos, o adesivo em forma de fita não induziu mudanças na liberação de citocinas de queratinócitos orais humanos.

3.5 Composição da microbiota oral em dentados e usuários de próteses

A quantidade de *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* em saliva estimulada foi investigada em 149 idosos, por Emilson, Thorselius¹⁷, em 1988. Mais de 10^6 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* por mL de saliva foram encontradas em 57% dos participantes, e 85% tinham mais de 10^5 UFC de *Lactobacillus* por mL de saliva. Não foi observada diferença na prevalência de *S. mutans* entre indivíduos dentados e desdentados, no entanto, um número significativamente maior de *Lactobacillus* foi detectado em usuários de próteses. Na maioria dos participantes com *S. sobrinus*, *S. mutans* estava concomitantemente presente. Os indivíduos que apresentaram tanto *S. mutans* quanto *S. sobrinus* tinham maiores índices salivares de *S. mutans* do que aqueles onde apenas uma das espécies eram detectadas.

Marsh et al.⁴⁰, em 1992, determinaram os efeitos do uso de prótese e da idade na prevalência de bactérias de significância odontológica e envolvidas no transporte de patógenos oportunistas presentes em placa bacteriana e saliva. Os participantes foram divididos em 4 grupos de acordo com a idade: de 20 a 39 anos (Grupo A), 40-59 anos (Grupo B), 60-79 anos (Grupo C), e com 80 anos ou mais (Grupo D). As proporções e frequência de leveduras e *Lactobacillus* em saliva e placa bacteriana foram maiores em usuários de próteses parciais removíveis, assim como as proporções de *Staphylococcus* e *S. mutans* foram também superiores nestes indivíduos. Quando os dados foram analisados quanto aos efeitos da idade, tanto leveduras quanto *Lactobacillus* refletiram aumento em saliva com a idade. A frequência de leveduras em placa bacteriana foi significativamente maior nos usuários de próteses do grupo com idade mais avançada (D) em relação ao grupo com idade menos avançada (A). *A. viscosus* predominou sobre *A. naeslundii* nos grupos com idade mais avançada, independentemente da presença de prótese. Espiroquetas e anaeróbios com pigmento negro foram encontrados em menor número em usuários de próteses. Os autores concluíram que, de uma maneira geral, os componentes da microflora oral em adultos podem ser influenciados tanto pela idade quanto pelo uso de próteses.

Aas et al.¹, em um estudo de 2005, objetivaram ampliar os conhecimentos sobre a diversidade bacteriana na cavidade oral humana saudável. Os autores se utilizaram de técnicas moleculares independentes de cultivo para detectar bactérias orais, incluindo espécies não cultiváveis até aquele momento. Foram analisados 9 sítios de 5 indivíduos clinicamente saudáveis. Os sítios analisados incluíram dorso lingual, laterais da língua, epitélio bucal, palato duro, palato mole, placa supragengival de superfícies dentárias, placa subgengival, vestíbulo maxilar anterior e tonsilas. Os genes *rRNA 16S* de amostras de DNA foram amplificados e clonados. Sequências de genes *rRNA 16S* foram utilizadas para determinar a identidade das espécies ou familiaridade próxima. Em 2589 clones, 141 espécies predominantes foram detectadas, das quais cerca de 60% ainda não haviam sido cultivadas. Treze novas espécies foram identificadas. Espécies comuns a todos os sítios pertenciam aos gêneros *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* e *Veillonella*. Enquanto algumas espécies foram específicas do indivíduo e detectadas em muitos sítios, outras espécies foram específicas do sítio. A maioria dos sítios possuía de 20 a 30 espécies predominantes, e o número dessas espécies em todos os nove sítios, por indivíduo, variou de 34 a 72. Espécies tipicamente relacionadas com periodontite e cáries não foram detectadas. Os autores observaram que a flora bacteriana predominante na cavidade oral saudável é distinta da flora bacteriana onde há doenças bucais, sendo altamente diversa e específica tanto do indivíduo quanto do sítio. Por exemplo, muitas espécies associadas especificamente com doença periodontal, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* não foram detectadas em nenhum dos sítios analisados, assim como a flora bacteriana comumente envolvida em cáries dentárias e cavidades profundas em dentina, representada por *S. mutans*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Atopobium* spp. não foi detectada nas placas supra e subgengivais de dentes clinicamente saudáveis. Os autores comentam que para uma análise mais profunda da associação de espécies bacterianas específicas com estados de saúde ou doença oral, é necessária uma análise de grandes quantidades de amostras clínicas para os níveis de essencialmente todas as bactérias orais, através de estudos clínicos bem controlados. Os autores destacam ainda que é importante definir totalmente a microflora humana relacionada ao estado de saúde oral para então entender o papel das bactérias no estado de doença oral.

Sachdeo et al.⁶⁹, no ano de 2008, ao observarem que estudos relacionados a biofilme de pacientes desdentados totais e usuários de dentaduras são limitados, propuseram uma investigação para fornecer dados que descrevam relacionamentos microbiológicos na cavidade oral de pacientes desdentados totais, e analisar a microbiota em superfícies de tecidos duros, moles e também na saliva de usuários de próteses totais. Para o estudo in vivo foram recrutados sessenta e um indivíduos desdentados totais com próteses maxilares e mandibulares. Amostras de biofilme foram colhidas nos 28 dentes de cada indivíduo. Também foram colhidas amostras de biofilme das superfícies dorsal, lateral e ventral da língua, assoalho da boca, mucosa jugal, palato duro, região vestibular/lábio, gengiva inserida e saliva. As amostras foram individualmente analisadas de acordo com seu conteúdo em relação a 41 espécies bacterianas, por meio de hibridização *checkerboard DNA-DNA*, sendo a quantidade e proporção de cada espécie determinada de acordo com a localização. Patógenos periodontais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* foram claramente identificados nas amostras dos indivíduos desdentados. Perfis microbianos em amostras de superfícies de tecidos moles diferiram de acordo com a localização. Amostras colhidas da região do dorso lingual mostraram os maiores índices de concentração bacteriana, seguido pela região de gengiva inserida e região lateral da língua, enquanto as menores concentrações bacterianas foram encontradas em amostras da região de mucosa jugal e véstíbulo labial. Um dos maiores achados deste estudo foi a detecção de patógenos periodontais (*A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*) em indivíduos desdentados, pois acreditava-se que estas espécies desapareciam após a remoção dos dentes. Ainda, foram encontrados perfis microbianos diferentes de acordo com as superfícies para colonização. A microbiota da região dos dentes das próteses, superfície lateral da língua, dorsal da língua e saliva foram similares, e diferiram da microbiota encontrada nas outras seis superfícies de tecidos moles e região de palato da prótese. Ao comparar as contagens de DNA encontradas nas superfícies dorsais da língua, palatos protéticos e os palatos dos indivíduos, os valores mais altos foram encontrados no dorso lingual, seguido pela superfície polida (exterior) do palato da prótese, e por último palato duro dos indivíduos. Desse modo, os autores concluem que esta investigação consistiu no primeiro passo para a definição de

quais microrganismos estão associados com pacientes edêntulos, tanto em relação a tecidos moles (mucosa) quanto em relação à superfícies duras (base protética).

Do Nascimento et al.⁴⁴, em uma publicação de 2009, comentam que a técnica de hibridização DNA-DNA *checkerboard* permite a identificação simultânea de micro-organismos distintos em um grande número de amostras, se utilizando de mais de 45 sondas completas de DNA genômico para identificação de espécies bacterianas gram-negativas e gram-positivas, presentes em biofilmes subgengivais. Coletivamente, elas representam de 55 a 60% das bactérias presentes em biofilmes subgengivais, e esta é a maior vantagem deste em relação aos outros métodos moleculares com alta sensibilidade e especificidade. Em seu artigo, os autores apresentam a hibridização *checkerboard* de DNA como uma técnica alternativa interessante para a detecção e quantificação de espécies de *Candida* presentes na microbiota oral, uma vez que seus resultados revelaram que o método pode ter sua sensibilidade ajustada, além de ser eficaz e apropriado para o diagnóstico de infecções fúngicas orais.

Teles et al.⁷⁵, no ano de 2012, investigaram as diferenças no número e proporção de espécies bacterianas em dentes naturais e dentes de próteses totais, através de um período experimental de 7 dias, no qual houve ausência de higiene oral e ausência de higiene protética. Amostras de placa supragengival foram obtidas, antes e após limpeza profissional. As amostras foram analisadas utilizando hibridização DNA-DNA *checkerboard*, sendo a contagem e proporção de 41 espécies bacterianas determinada. O biofilme de desdentados antes da limpeza mostrou maior contagem e proporção de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, e *Streptococcus mutans*, enquanto indivíduos dentados demonstraram maiores proporções de *Tannerella forsythia*, *Selenomonas noxia* e *Neisseria mucosa*. Em relação ao dia 2, a contagem média de todas as taxas foi maior em dentes naturais, e a maioria permaneceu superior até o dia 7. Ambos os grupos demonstraram aumento nas proporções de *S. mitis* e *S. oralis* no dia 1. *N. mucosa*, *Veillonella parvula*, e *Eikenella corrodens* também aumentaram em ambos os grupos. Os autores puderam concluir que o biofilme “maduro” de dentes naturais e dentes de

próteses totais têm quantidade similar de bactérias, mas diferentes proporções de espécies.

Valentini et al.⁸¹, em 2013, analisaram como o desenvolvimento do biofilme e sua composição são afetados pelo tempo e pelo tipo de material da prótese, em usuários de próteses totais com e sem estomatite protética. Espécimes confeccionados em resina acrílica (controle) e confeccionados com reembasadores protéticos (à base de resina acrílica e à base de silicone) foram adaptados na superfície interna das próteses totais de 30 indivíduos. Biofilmes foram formados em dois períodos de 21 dias, e a contagem de micro-organismos viáveis no biofilme acumulado foi determinada após 7, 14 e 21 dias. A contagem de espécies de *Candida não-albicans* foi maior em pacientes com estomatite protética que utilizaram o reembasador à base de silicone. Os participantes com estomatite protética também tiveram maior contagem de *S. mutans* após o período de 7 dias. Já a formação de biofilme em maiores períodos de tempo não resultou em diferenças na composição deste. Desta maneira, os autores concluíram que o reembasador à base de silicone utilizado neste estudo acumulou maiores quantidades de biofilme, por isso seu uso deve ser cuidadosamente planejado.

Segundo O'Donnell et al.⁴⁹ (2015), apesar da composição da placa dentária estar já bem definida, há informações limitadas sobre como esta influencia no desenvolvimento da estomatite protética. Desse modo, os autores lideraram uma pesquisa com o objetivo de estudar a microbiota de usuários de próteses e buscar interações entre diferentes espécies microbianas e hospedeiro-patógenas encontradas no ambiente oral. Amostras foram obtidas de 123 indivíduos usuários de próteses totais ou parciais, utilizando-se *swabs*. Foram coletadas amostras das bases protéticas, mucosa e de dentes, quando estes estavam presentes. A composição bacteriana de cada amostra foi determinada por meio de sequenciamento *bar-coded illumina MiSeq* da região bacteriana hipervariável V4 do 16S *rDNA*. O processamento dos dados do sequenciamento foi realizado por meio de *QIIME*, agrupado em Unidades Taxonômicas Operacionais, e atribuídos à taxonomia. As próteses eram sonicadas para remover a flora microbiana existente, e eram cultivadas utilizando o meio de diagnóstico *Colorex Candida*. Amostras de

saliva não-estimulada foram obtidas e níveis de peptídios antimicrobianos foram mensurados por *ELISA*. Os autores encontraram diferença entre a placa encontrada nos dentes e a placa encontrada nas próteses, em relação à composição e à diversidade. Também notaram que a composição microbiana oral de um usuário de prótese é variável e influenciada pela localização na boca. Foi observado que as próteses e a mucosa são colonizados basicamente por *Bacilli* e *Actinobactérias*. Ainda, foi observado que a presença de dentes naturais tem um significativo impacto na composição microbiana de um modo geral, quando comparados à edêntulos totais. Os autores notaram que o aumento dos níveis de espécies de *Candida* correlacionaram-se positivamente com espécies de *Lactobacillus*. Peptídios antimicrobianos foram quantificados, apesar de não mostrarem correlações específicas. Foi concluído que os reinos fúngico e bacteriano têm claro envolvimento na progressão da estomatite protética, embora o estudo não tenha sido capaz definir o papel dos peptídios antimicrobianos.

3.6 Desenvolvimento de biofilmes multiespécies

Em 2006, Thein et al.⁷⁷ analisaram o efeito de oito espécies bacterianas comensais orais, aeróbicas e anaeróbicas, no desenvolvimento in vitro de biofilmes de *Candida albicans*. As espécies bacterianas estudadas foram *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus intermedius*. A formação de biofilme foi quantificada em razão da habilidade do fungo para se desenvolver sobre superfícies plásticas de poliestireno em co-cultura com as espécies bacterianas mencionadas. A contagem de células viáveis foi utilizada para quantificar o crescimento de leveduras, e microscopia eletrônica de varredura foi empregada para confirmar e visualizar formação de biofilme. Quando altas concentrações de cada uma das bactérias foram utilizadas, observou-se redução significativa na contagem de leveduras no biofilme de *Candida*, refletindo assim efeito inibitório. Isto não aconteceu apenas para as espécies *L. acidophilus*, *S. mutans* e *S. intermedius*. Tal redução sobre o desenvolvimento de biofilme de *Candida* pode ter ocorrido por algumas razões, como alta cobertura superficial pelo grande número de bactérias e competição por sítios para colonização, inibição do

desenvolvimento de biofilme devido à presença física de inúmeras bactérias em um mesmo nicho, devido ao efeito de metabólitos bacterianos na formação e desenvolvimento do biofilme, ou em decorrência da competição por nutrientes em um pequeno espaço. Durante análise de regressão, uma correlação negativa entre a concentração das culturas de *P. gingivalis* e *E. coli* e a contagem de leveduras viáveis em biofilme foi notada, no entanto isto não ficou evidente para as demais espécies bacterianas. Os autores concluíram que, de uma maneira geral, seus dados mostraram as bactérias tem a capacidade de modular a formação de biofilme de *C. albicans* em ambientes com espécies mistas, como a cavidade oral. Citam ainda que mais estudos são necessários para esclarecer o modo como as bactérias modulam biofilmes de *Candida*, e relacionar estes achados com o ambiente oral.

Thein et al.⁷⁸, em 2007, exploraram a interação entre duas espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. krusei*) na formação de biofilmes sobre superfícies protéticas. Duas cepas de *C. albicans* e de *C. krusei*, com alta e baixa capacidade de formação de biofilme, foram utilizadas. Biofilmes foram desenvolvidos sobre superfícies protéticas em resina acrílica, aerobicamente e a 37°C, sob saliva natural, sendo o crescimento quantificado pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia. Os dados resultantes sugeriram que características qualitativas e quantitativas de uma espécie de *Candida* modificam a fisiologia da outra espécie durante co-existência em um biofilme. Ainda, a saliva humana pode modular este processo dependendo de sua natureza, número de espécies do habitat e também se a saliva está em suspensão ou em fase imobilizada. Os autores destacam que como seu estudo foi limitado a duas espécies de *Candida*, investigações mais abrangentes com outras espécies de fungos, assim como com bactérias, são necessárias para desvendar a complexidade associada a biofilmes multiespécies formados na cavidade oral.

Pereira-Cenci et al.⁶⁰, em 2008, analisaram a formação de biofilme de espécies duais ou isoladas em vários substratos, e buscaram determinar os efeitos de saliva total e da bactéria *S. mutans* neste processo. Discos em hidroxiapatita, polimetilmetacrilato e confeccionados com um reembasador de próteses macio (com agente antifúngico) foram usados como substratos. A contagem de microrganismos

viáveis acumulados na camada de biofilme foi determinada e convertida em Unidades Formadoras de Colônia por área de superfície. Microscopia confocal de varredura a laser foi utilizada para caracterizar os biofilmes e quantificar o número de hifas em cada condição testada. Observou-se diminuição na contagem de colônias de *C. albicans* e *C. glabrata* por milímetro quadrado em todos os substratos. A diminuição foi maior nos discos de hidroxiapatita, seguidos pelos discos de polimetilmetacrilato e por último os discos feitos com reembasador macio. O crescimento de biofilme nos espécimes submersos em saliva demonstrou menor quantidade de *C. glabrata* do que os espécimes onde não houve saliva. A presença de glicose e de *S. mutans* refletiu uma inibição na formação de hifas de *C. albicans*. Biofilmes com espécies duais de *Candida* não demonstraram interação competitiva entre as espécies. Os autores concluíram, por fim, que biofilmes de *Candida* são significativamente afetados por saliva, tipo de substrato e pela presença de outros microrganismos.

3.7 Uso de probióticos de *Lactobacillus* spp. no combate à estomatite protética - estudos clínicos

Em 2015, Ishikawa et al.²⁷ analisaram o efeito de probióticos, a curto prazo, na redução do nível de infecção de *Candida* oral em usuários de próteses totais com candidíase assintomática. O estudo clínico randomizado e duplo-cego contou com a participação de 59 usuários de próteses totais que continham espécies de *Candida* na cavidade oral, mas não apresentavam sintomatologia, sendo estes divididos em dois grupos: “probiótico” e “placebo”. Todos foram instruídos a promoverem a limpeza diária das próteses. O grupo “probiótico” fazia uso diário de uma cápsula contendo *Lactobacillus rhamnosus* HS111, *Lactobacillus acidophilus* HS101, e *Bifidobacterium bifidum*, enquanto o grupo “placebo” foi submetido ao mesmo regime mas com cápsulas sem conteúdo significativo. Os níveis de infecção foram avaliados em amostras obtidas da região palatina antes e após o período experimental de 5 semanas. Após o período experimental, a taxa de detecção de espécies de *Candida* foi de 92% no grupo “placebo”, e de 16,7% no grupo “probiótico”. A redução proporcionada pelo regime com probiótico foi independente de características iniciais, como nível de infecção, tempo de uso da prótese ou

outras variáveis. Desta maneira, pôde-se concluir que a cápsula probiótica foi efetiva na redução da colonização da cavidade oral por *Candida* em indivíduos usuários de próteses totais com candidíase assintomática, sugerindo que um produto com *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum* poderia representar um tratamento alternativo a ser empregado na prevenção de candidíase oral.

Miyazima et al.⁴³, em 2017, analisaram o efeito do consumo de dois queijos experimentais contendo probióticos na colonização oral de *Candida* de usuários de próteses totais. Sessenta usuários de próteses totais portadores de *Candida* foram aleatoriamente distribuídos em grupos que receberam queijo com *Lactobacillus acidophilus* NCFM ou *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32 diariamente por 8 semanas, e um grupo controle que recebeu queijo sem probióticos. Os pesquisadores obtiveram amostras através de lavagem oral, e os níveis de *Candida* foram determinados (UFC/mL) no início e após o período experimental de 8 semanas. Os autores concluíram que o consumo diário de queijo com os dois probióticos testados reduziu a colonização oral de *Candida* nos participantes da pesquisa.

3.8 Uso de probióticos de *Lactobacillus* spp. no combate à candidíase urogenital

Wang et al.⁸², em 2017, estudaram os efeitos de cepas de *Lactobacillus*, espécie bacteriana existente no aparelho genital feminino e conhecida por sua capacidade de defesa contra micro-organismos patógenos, sobre o desenvolvimento, formação de hifas e expressão de genes relacionados à virulência de *C. albicans* ATCC 10231. Foram estudadas as espécies bacterianas *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii*. Os autores encontraram que *L. crispatus* demonstrou a maior atividade antimicrobiana em ensaio de meio líquido baseado em microplacas, e associaram estes efeitos à produção de alguns compostos antimicrobianos, juntamente com a produção de peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos. Desta maneira, concluíram que seus resultados sugerem que *L. crispatus*, uma espécie bacteriana associada à microbiota vaginal saudável, pode inibir fortemente o

desenvolvimento de *C. albicans* e formação de hifas, representando um micro-organismo útil para investigação probiótica.

Niu et al.⁴⁷, em 2017, ao estudarem os fatores relacionados à candidíase vulvovaginal, exploraram a bactéria *Lactobacillus crispatus* em relação à sua capacidade de atuar na resposta imune de células epiteliais vaginais contra *C. albicans*. Os autores destacam como conclusões de seu estudo que *L. crispatus* pode amenizar a virulência de *C. albicans*, modular a secreção de citocinas e quimiocinas, e promover respostas imunes locais contra patógenos na mucosa vaginal.

Mezzasalma et al.⁴², também em 2017, avaliaram o efeito da administração oral de formulações probióticas com propriedades antimicrobianas sobre infecções uro-genitais. Um estudo piloto randomizado duplo-cego foi feito com 60 mulheres em situação pré-menopausa, sendo as participantes divididas em dois grupos que recebiam doses diárias de misturas probióticas e um grupo placebo: (1) *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus reuteri*, (2) *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, (3) placebo. Swabs eram coletados da região uro-genital em 4 períodos experimentais, nos dias 0, 7, 14 e 21, e eram analisados por qPCR. Ao mesmo tempo, a atividade antimicrobiana das formulações probióticas era verificada por ensaios in vitro contra micro-organismos como *Escherichia coli* e *C. albicans*. Foi observado que as duas formulações probióticas testadas demonstraram propriedades antimicrobianas similares contra os patógenos responsáveis pela disbiose e infecções vaginais, após sua administração oral. Os autores destacam que este trabalho representa a base para futuras investigações sobre prevenção e tratamento das infecções uro-genitais com as formulações probióticas testadas.

3.9 Interações variadas entre *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp.

Bilhan et al.⁶, em um trabalho de 2009, investigaram a relação da estomatite protética com a presença de hifas de *C. albicans* e *Lactobacillus*. Noventa e um participantes usuários de próteses totais bimaxilares participaram do estudo.

Amostras foram coletadas da região palatina com *swabs* e das regiões que apresentavam inflamação, além de coleta de saliva. Foi feita contagem de Unidades Formadoras de Colônias para *Candida*, e *Rogosa Agar* foi utilizado como meio seletivo para o isolamento de espécies de *Lactobacillus*, sendo examinadas por coloração *Gram* todas as colônias diferentes que cresceram nas placas. Os resultados indicaram uma associação entre a contagem de *Lactobacillus* e *C. albicans*, indicando desta forma que espécies de *Lactobacillus* parecem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da estomatite protética. Apesar de uma importante evidência científica sobre o assunto, o uso de *Ágar Rogosa* como meio seletivo para o desenvolvimento de espécies de *Lactobacillus* mostra-se como um viés do estudo, visto que este meio permite a possibilidade de crescimento de outras espécies.

Orsi et al.⁵³, em 2014, investigaram o efeito de diferentes espécies de probióticos de *Lactobacillus* na formação de hifas e desenvolvimento de biofilme de *C. albicans*. Quatro diferentes espécies de *Lactobacillus* foram estudadas, sendo elas: *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *L. reuteri*, além de duas cepas de *Candida albicans*: referência 286 e seu isogênico mutante *hwp1/hwp1*, a cepa FJS24. Após análise morfológica e ensaios colorimétricos quantitativos, os autores explicam que probióticos de *Lactobacillus* infiltraram nos fluidos sobrenadantes, apresentando efeitos inibitórios tanto na formação de hifas como na produção de biofilme de *C. albicans*, independente do genótipo. Dessa maneira, destacam que os dados apresentados em seu trabalho fornecem evidências iniciais sobre a habilidade dos probióticos de *Lactobacillus* em prejudicar a característica de virulência de *C. albicans*, através de inibição da transição morfológica, além de inibirem a produção de biofilme e também atuarem no controle de danos fúngicos em biofilmes pré-formados.

Li et al.³⁴, em 2014, avaliou a eficácia e segurança, à curto prazo, do uso de probióticos como coadjuvante no tratamento de estomatite oral associada à *Candida*, em um estudo aleatorizado controlado. Usuários de próteses totais ou parciais não foram incluídos neste estudo, uma vez que as próteses poderiam funcionar como fatores de interferência local, e influenciarem os resultados. O

estudo contou com a participação de 65 indivíduos, que utilizaram apenas agentes antifúngicos locais (gargarejo com solução de bicarbonato de sódio 2% por 30 segundos, seguido de intervalo de 10 minutos e em seguida aplicação de pasta com 2% de nistatina) ou estes mesmos agentes acompanhados de probióticos locais (mistura de *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*), três vezes por dia, por 4 semanas. Parâmetros como hiperemia, cultura de saliva, coleta de amostras do dorso lingual com *swab* e reações adversas foram avaliadas ou registradas no início, meio e no fim do tratamento. Apesar das características iniciais dos participantes serem similares, ambos os grupos apresentaram redução no nível de dor e hiperemia na mucosa lingual após o período de 4 semanas. A taxa de detecção de espécies de *Candida* diminuiu em ambos os grupos, mas se mostrou menor no grupo onde foram utilizados probióticos. Dessa maneira, os autores concluíram que a inclusão de probióticos administrados localmente auxiliou na melhora de certas condições clínicas e reduziu a prevalência de *Candida*, porém destacam que o impacto de probióticos em espécies de bactérias orais deve ser melhor investigado.

Matsubara et al.⁴¹, em 2016, analisaram o efeito inibitório de espécies de probióticos de *Lactobacillus* em diferentes fases do desenvolvimento de biofilme de *C. albicans*. A quantificação do desenvolvimento de biofilme e análises ultraestruturais foram feitas com biofilmes de *Candida albicans* tratados com *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, tanto com as células planctônicas como com seus sobrenadantes. Sobrenadantes de *L. rhamnosus* não apresentaram efeito sobre biofilme maduro, mas atuaram significativamente em estágios precoces da formação de biofilmes de *Candida*. Análises por microscopia revelaram que suspensões de *L. rhamnosus* reduziram a diferenciação de hifas de *Candida*, levando a uma predominância de desenvolvimento por brotação. Todos os *Lactobacillus* atuaram tanto na redução da diferenciação de espécies de *Candida* de levedura para hifa, quanto na formação de biofilme. Os efeitos inibitórios dos probióticos de *Lactobacillus* sobre *C. albicans* envolveram tanto interações célula-célula quanto a secreção de metabólitos que podem ter impacto em características patogênicas associadas à colonização de *C. albicans* nas superfícies hospedeiras e filamentação de leveduras. Os autores

ressaltam que seu estudo esclareceu, pela primeira vez, o mecanismo como espécies de *Lactobacillus* atuam na inibição da colonização por *C. albicans*, suportando deste modo seu uso como adjunto no tratamento de candidíase.

do Carmo et al.¹⁰, em 2016, analisaram as propriedades probióticas de espécies de *Lactobacillus* bem caracterizadas, segundo os autores. Foram analisadas as espécies *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus* em relação à sua capacidade probiótica contra *C. albicans*. O potencial probiótico foi investigado segundo os seguintes critérios: adesão às células epiteliais e muco do hospedeiro, formação de biofilme, co-crescimento com patógenos bacterianos, inibição de adesão do patógeno ao muco e atividade antimicrobiana. De uma maneira geral, os autores concluíram que *L. fermentum* ATCC 23271 é um candidato à probiótico em potencial, particularmente no complemento ao tratamento da candidíase, considerando que apresentou o melhor perfil probiótico em comparação às outras cepas de *Lactobacillus* testadas.

Em uma publicação de 2016, Allison et al.³ exploraram a literatura atual relacionada à *Candida* e bactérias clinicamente importantes, avaliando tais interações nos contextos de patogênese, diagnóstico e manejo de doenças. Os autores buscaram entender melhor possíveis relações de sinergismo ou antagonismo entre diferentes reinos microbiológicos, tendo como foco espécies de *Candida*. Durante o relato de trabalhos que correlacionam espécies de *Candida* e *Lactobacillus*, citam que *Lactobacillus* isolados da cavidade oral tem a capacidade de inibir o crescimento de *Candida albicans* através da produção de H₂O₂. Também é relatada a associação destas espécies no aparelho genital feminino, onde *Lactobacillus* agem como barreira contra infecção de outros patógenos pela competição por adesão e produção de componentes antimicrobianos, como H₂O₂. Desta maneira, os autores indicam que os dados da literatura sugerem efeito inibitório de *Lactobacillus* sobre desenvolvimento de *Candida*, formação de hifas e produção de biofilme. Por fim, concluem que é importante uma maior averiguação de tais efeitos inibitórios de espécies de *Lactobacillus* em espécies de *Candida*.

Oliveira et al.⁵¹, também em 2016, investigaram se a interação de *C. albicans* (ATCC18804) com *L. rhamnosus* (ATCC7469) interfere em sua expressão de fatores de virulência. Foi feito o desenvolvimento conjunto dos micro-organismos em biofilmes por 24, 48 e 72 horas e posteriormente *Candida* foi isolada e a expressão dos maiores fatores de virulência foi investigada. A produção de fosfolipase, protease e hemolisina foi observada em meio apropriado, foi feita a observação de formação de tubos germinativos, e observou-se a formação de biofilme após desenvolvimento em placas de microtitulação e leitura em espectrofotômetro. A *Candida* foi também analisada quanto à sensibilidade antifúngica a Anfotericina B, fluconazol e cetoconazol. Os resultados mostraram que *L. rhamnosus* pode influenciar a expressão de fatores de virulência por *C. albicans*, e tem a capacidade de alterar seu perfil de sensibilidade antifúngica, sugerindo que esse micro-organismo pode atuar na redução da patogenicidade de *Candida* e atuar em terapias e controle de candidíase.

Bulgasem et al.⁹, ainda em 2016, investigaram o possível efeito antifúngico de bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de mel natural. Teste de catalase e coloração de gram foram aplicados para detecção das bactérias, e quatro demonstraram efeito inibitório sobre espécies de *Candida*. Elas foram identificadas como *Lactobacillus plantarum* HS, *Lactobacillus curvatus* HH, *Pediococcus acidilactici* HC e *Pediococcus pentosaceus* HM. O desenvolvimento de *C. glabrata* ATCC 2001 foi fortemente inibido por *L. curvatus* HH e *P. pentosaceus* HM. A atividade antifúngica do sobrenadante bruto foi avaliada e também refletiu atividade antifúngica em relação a espécies de *Candida*. Os autores concluíram de seu estudo que bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de mel produziram componentes que podem ser utilizados na inibição do desenvolvimento de espécies patogênicas de *Candida*.

Jørgensen et al.²⁸, em 2017, investigaram o potencial antifúngico do probiótico bacteriano *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938 e ATCC PTA 5289) contra seis espécies de *Candida* orais (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, e *C. parapsilosis*). Os *Lactobacillus* foram testados quanto à sua capacidade de co-agregar e inibir o crescimento das cepas, o que foi observado

através de espectrofotometria e ensaio de inibição de sobreposição de ágar. Adicionalmente, o pH era avaliado através de microsensores, e a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos *Lactobacillus* era verificada. Os autores observaram que *L. reuteri* exibiu propriedades antifúngicas contra 5 das 6 espécies de *Candida* orais mais comuns, não tendo ação apenas contra *C. krusei*. Desta maneira, os achados refletiram que a capacidade probiótica de *L. reuteri* é cepa específica.

Song et al.⁷², em 2017, estudaram a atividade antifúngica de probióticos em relação a *C. albicans* e os efeitos inibitórios destes em biofilmes de *Candida* sobre a superfície protética. Biofilme de *Candida* foi formado em uma resina de base protética e em seguida foi tratado com *L. rhamnosus* e *L. casei*. Ainda, biofilmes das duas espécies bacterianas foram desenvolvidos e em seguida tratados com *C. albicans*. Os autores observaram que *L. rhamnosus* ATCC 53103 e *L. casei* ATCC 334 mostraram forte atividade antifúngica, e desta maneira concluíram que estas bactérias poderiam ser eficazes no tratamento de estomatite protética.

Rossoni et al.⁶⁸, também em 2017, explica que probióticos têm sido descritos como uma potencial estratégia para controlar infecções oportunistas devido à sua habilidade de estimular o sistema imune, e por isso os autores avaliaram se isolados clínicos de espécies de *Lactobacillus* estão aptos a prover proteção contra infecções de *C. albicans*. Neste trabalho, o modelo de hospedeiro não-vertebrado *Galleria mellonella* (espécie de insetos) foi utilizado. Resumidamente, cepas clínicas de *Lactobacillus* isoladas da cavidade oral de pacientes saudáveis mostraram variáveis atividades probióticas contra *Candida albicans*. A cepa 28,4 de *L. paracasei* representa um probiótico novo em potencial que pode ser utilizado para controlar infecções de *C. albicans*. Além disso, o estudo indicou que exposição prévia a uma porção de *L. paracasei* ativa o sistema imune de *G. mellonella*, o que pode permitir o combate à infecções letais por *C. albicans*. Assim, este estudo também demonstrou que *G. mellonella* é um modelo adequado para analisar aspectos específicos da imunomodulação probiótica.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

Para a realização deste estudo foram utilizados os seguintes Materiais de Consumo e Materiais Permanentes, descritos nos Quadros 1 e 2, respectivamente:

Quadro 1- Materiais de Consumo com respectivos nomes comerciais e fabricantes (continua)

- Adesivo instantâneo Super Bonder, Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, São Paulo, Brasil.
- Água destilada.
- Água Milli-Q.
- Alças descartáveis calibradas para inoculação de micro-organismos, Labplast, Corunha, Espanha.
- Álcool Etílico Hidratado 70º, Tupi, Ibaté, SP, Brasil.
- Béquer graduado, Vidrolabor, Paulínia, SP, Brasil.
- Bico de Bunsen.
- Buril de Le cron, Duflex SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Caneta para retroprojeto, Faber Castell, São Carlos, SP, Brasil.
- Corega Fita Adesiva para dentadura, GlaxoSmithKline Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Cubeta para espectrofotômetro, volume 1,5 mL, Hach, Jundiaí, São Paulo, Brasil.
- Cultura de *Candida albicans* SC 5314.
- Cultura de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.
- Equipamentos de Proteção Individual (EPI): Toucas, máscaras e luvas, Descarpac, São Paulo, SP, Brasil.
- Erlenmeyer graduado, Vidrolabor, Paulínia, SP, Brasil.
- Espátula para gesso Jon Jon, São Paulo, SP, Brasil.
- Espátula de aço nº 36 Duflex SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Fresa tipo Maxicut, Malleifer SA, Ballaigues, Suíça.

Quadro 1- Materiais de Consumo com respectivos nomes comerciais e fabricantes (continuação)

Gesso pedra tipo III, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- Gesso pedra tipo IV, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Isolante para resina acrílica Cel-Lac, Artigos Odontológicos Clássico Ltda, São Paulo, SP, Brasil.
- Lâminas de vidro, ACP Comércio de Vidros LTDA. EPP, Vidroplan, Araraquara, SP, Brasil.
- Lixas d' Água Norton, Grão 100 e Grão 120 (T 223), Saint-Gobain do Brasil Produtos Industriais e para Construção Ltda., Guarulhos, SP, Brasil.
- Micropipetas, Boeco, Alemanha.
- Mufla metálica, OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
- Pinça clínica de aço Duflex SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Pipetas sorológicas descartáveis, volumes variados, Prolab, São Paulo, Brasil.
- Placa de Petri descartável estéril 90x15mm, Prolab, São Paulo, SP, Brasil.
- Placa de vidro grossa 15x07x20 mm polida, PR Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos, Florianópolis, SC, Brasil.
- Placa para cultura celular de 12 orifícios, Costar, Corning Incorporated, NY, EUA.
- Placa para cultura celular de 24 orifícios, Costar, Corning Incorporated, NY, EUA.
- Placas Prontas de Ágar Sangue 90 mm, Laborclin, Vargem Grande, Pinhais, Paraná, Brasil.
- Pontas descartáveis para micropipeta, Axygen, Corning Life Sciences, New York, EUA.
- Pote paladon de vidro, Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil.
- Resina acrílica Lucitone 550, Dentsply International Inc., York, PA, EUA.
- Silicona de condensação Zetaplus, Zermack, S.P.A., Badia Polesine, Rovigo, Itália.
- Sistema de filtração Nalgene Rapid Flow, 500 mL, Rochester, NY, EUA.
- Solução de glicose 10%.

Quadro 1- Materiais de Consumo com respectivos nomes comerciais e fabricantes (conclusão)

- Solução salina - NaCl 0,89%.
- Tubos de ensaio de vidro sem orla, 20x150mm, Pyrex, Corning, Jundiaí, São Paulo, Brasil.
- Tubos para centrifuga em polipropileno, 50 mL, Ato, EUA.
- Tubos para centrifuga, 15 mL, Prolab, São Paulo, SP, Brasil.
- Tryptone, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha.
- Ultra Corega Creme sem sabor, 40g, GlaxoSmithKline Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Vaselina sólida, Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
- Yeast Extract, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha.

Quadro 2- Materiais Permanentes com respectivos nomes comerciais e fabricantes.

- Agitador de tubos orbital, Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil.
- Autoclave vertical, Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil.
- Balança de precisão eletrônica, Bel Engineering, Monza, Itália.
- Balança de precisão, Gehaka– Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, Brasil.
- Câmara de fluxo laminar vertical, Pachane Indústria e Comércio Ltda., Piracicaba, São Paulo, Brasil; Modelo: PA 115; No 12898.
- Centrífuga, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha; Modelo: 5810R.
- Espectrofotômetro, CMC Laboratório Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Estufa bacteriológica, Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, São Paulo, Brasil; Modelo: MA 0324; Série – 9819011.
- Estufa de cultura, Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil; Modelo: 002CB.
- Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil; Modelo: MA 033; No9819.
- Forno de micro-ondas, Continental AW-30, Continental Eletrodomésticos, Hortolândia, São Paulo, SP, Brasil.
- Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL, Modelo JSM-6610LV. Modo de vácuo de alta resolução: 3,0 nm (30kV). Modo de vácuo de baixa resolução: 4,0nm. Tensão de aceleração: 0,3-30 kV. Ampliação :25 x a 300.000x.
- Prensa hidráulica, Vipi-delta Máquinas especiais, Pirassununga, SP, Brasil.
- Rugosímetro Digital, Mytutoyo Corporation, Tóquio, Japan; Modelo: SJ 400.
- Termopolimerizadora automática, Solab Equipamentos para laboratórios Ltda., Piracicaba, SP, Brasil.
- Ultrassom, 1440 Plus, Odontobras, São Paulo, SP, Brasil.

4.2 Método

4.2.1 Confeção de espécimes de resina acrílica

O processo de confecção dos discos de resina acrílica baseou-se em metodologia específica³⁹. Os discos de resina acrílica foram confeccionados a partir de matrizes metálicas, apresentando em seu interior 10 orifícios com 15mm de diâmetro e 3mm de espessura (Figura 1). Foram confeccionados 144 espécimes (N=144) com a resina acrílica *Lucitone 550* para as análises de adesão e formação de biofilme.

Figura 1 - Matriz metálica usada na confecção dos discos de resina acrílica.



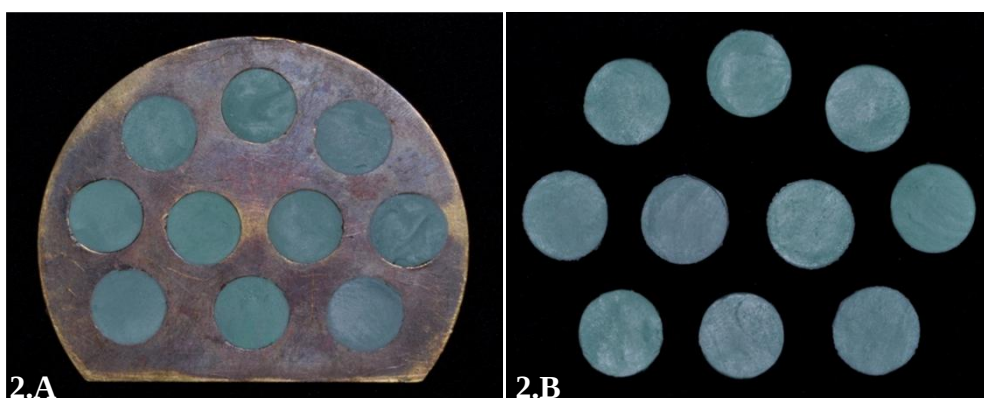
Fonte: Elaboração própria.

4.2.1.1 Inclusão dos discos de silicona

Inicialmente, discos feitos com silicona de condensação de consistência densa foram obtidos através da condensação manual desse material no interior dos orifícios da matriz metálica (Figuras 2A e 2B), e placas de vidro foram utilizadas para atribuir regularidade às superfícies. Após a polimerização, os discos de silicona foram fixados com adesivo instantâneo sobre uma lâmina de vidro (Figura 3), e o conjunto composto por discos de silicona e lâmina de vidro foi incluído em mufla metálica utilizando-se gesso pedra tipo III (Figura 4). Após presa do gesso, os espaços existentes entre os discos de silicona previamente fixados na lâmina de

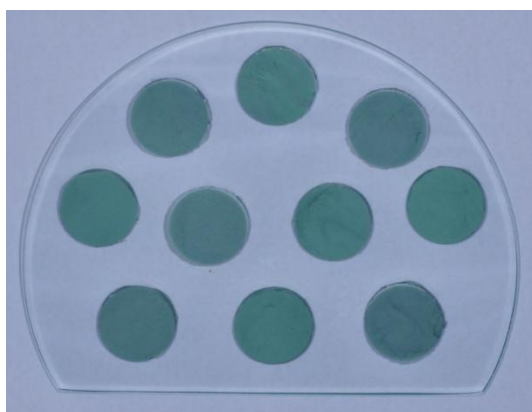
vidro foram preenchidos com gesso pedra tipo IV (Figura 5). Em seguida, após a presa do gesso tipo IV, uma nova lâmina de vidro foi posicionada sobre o conjunto composto por discos de silicona e gesso tipo IV, a contra-mufla foi posicionada e a inclusão finalizada com gesso pedra tipo III (Figura 6). Foi aguardado um período de 30 minutos sob a prensa, com carga de 0,5 toneladas.

Figura 2 - Discos de silicona de condensação confeccionados com uso de matriz metálica.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 - Discos de silicona de condensação fixados em lâmina de vidro.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Conjunto discos de silicona e lâmina de vidro incluídos em mufla metálica com gesso pedra tipo III.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Espaços entre os discos de silicona preenchidos com gesso pedra tipo IV.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Lâmina de vidro incluída na contra-mufla.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.1.2 Manipulação, prensagem e polimerização da resina acrílica

Após a abertura da mufla, foi feita a remoção dos discos de silicona de condensação (Figura 7), e foi realizado o isolamento do gesso com isolante para resinas acrílicas. A proporção pó/líquido e manipulação da resina acrílica utilizada foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (21 gramas do pó para cada 10 mL de líquido). A resina acrílica termopolimerizável *Lucitone 550* foi escolhida para a confecção dos espécimes nesta pesquisa por ser comumente utilizada na confecção de bases protéticas^{15,57}. O polímero da resina acrílica foi pesado em uma balança eletrônica com precisão de 0,001g e o líquido mensurado com auxílio de uma pipeta. Ao atingir a fase plástica, a massa de resina acrílica foi adaptada nos orifícios onde estavam os discos de silicona de condensação, e a prensagem foi realizada sob prensa hidráulica em duas etapas, uma prensagem inicial e uma final. Para a prensagem inicial, uma carga de 0,5 toneladas foi exercida, e então a mufla foi aberta e os excessos de resina acrílica foram eliminados com auxílio de um buril de *Le Cron*. A mufla foi novamente fechada e levada à prensa, onde foram aplicadas cargas gradativas de 0,5, 0,75 e 1,00 toneladas. Para uma correta acomodação da resina no interior da mufla e uma agregação adequada do monômero ao polímero da resina acrílica, foi aguardado um período de 30 minutos sob a prensa (Figura 8). Posteriormente, as muflas foram colocadas em prensas metálicas para cocção e levadas para polimerização. O

processo de polimerização da resina acrílica foi realizado em termopolimerizadora automática (Figura 9), de acordo com recomendações do fabricante, sendo escolhido o ciclo curto (90 minutos a 73°C e 30 minutos a 100°C).

Figura 7 - Remoção dos discos de silicone para prensagem de resina acrílica.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Mufla sob prensa hidráulica.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Termopolimerizadora automática utilizada para polimerização da resina acrílica.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.1.3 Desinclusão e acabamento

Após a polimerização, as muflas foram resfriadas sobre bancada por 24 horas e, então, os discos de resina foram desincluídos. Os excessos laterais verificados nos espécimes foram removidos com auxílio de micromotor e uma fresa do tipo *Maxicut* (Figura 10). Após o acabamento, os espécimes foram armazenados em água destilada por 48 horas a 37°C, para que ocorresse a eliminação do monômero residual^{38,39}.

Figura 10 - Discos de resina acrílica após acabamento dos excessos laterais.

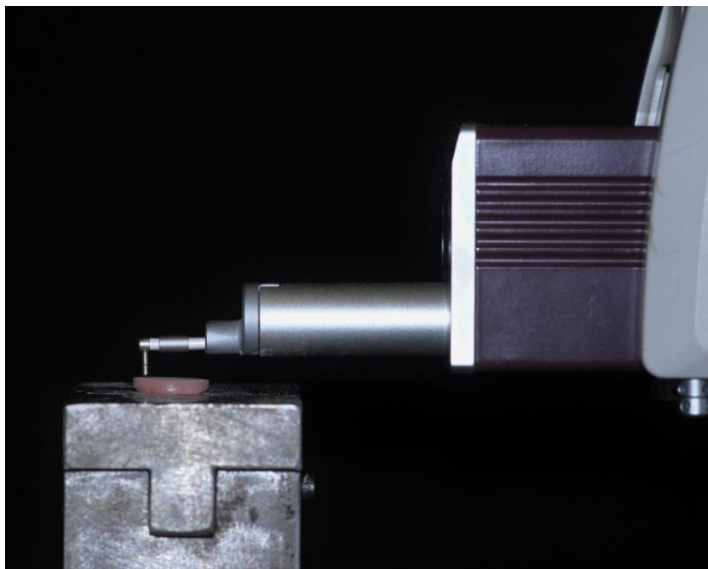


Fonte: Elaboração própria.

4.2.1.4 Padronização da rugosidade superficial

A rugosidade superficial de cada superfície dos discos foi padronizada pelo polimento destas com lixas d'água de diferentes granulações (100 e 120), acompanhada da mensuração da rugosidade das superfícies por um rugosímetro (Figura 11), buscando assim reproduzir a rugosidade superficial interna média de bases protéticas⁸³. Foi utilizado rugosímetro com precisão de leitura de 0,01 μm , comprimento de leitura de 2,4 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s, e raio da ponta ativa de 5 μm ⁵⁶. Em cada espécime foram realizadas quatro mensurações no total, sendo duas em cada superfície. A média entre as leituras foi determinada como o valor da Rugosidade (μm). Os espécimes utilizados nesta pesquisa possuíam valor de rugosidade superficial média de aproximadamente 3,0 μm ^{56,83} ($\pm 0,3$).

Figura 11 - Mensuração da rugosidade das superfícies dos espécimes por rugosímetro.

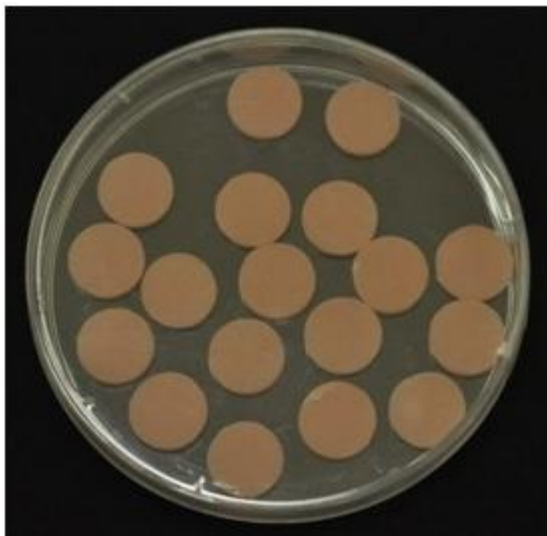


Fonte: Elaboração própria.

4.2.1.5 Desinfecção dos espécimes

Após a padronização da rugosidade superficial, os espécimes foram desinfetados por meio de exposição à luz ultravioleta no interior da câmara de fluxo laminar vertical, em ambas as superfícies e por 20 minutos cada, sendo posteriormente armazenados por no máximo 24 horas em placas de petri descartáveis estéreis, e que foram mantidas seladas até o momento do uso (Figura 12).

Figura 12 - Espécimes desinfetados e com rugosidade superficial padronizada.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Análises Microbiológicas

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, sob a supervisão da Profa. Dra. Marlise Inêz Klein, Professora Pesquisadora na Área de Biologia Molecular Aplicada à Microbiologia do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Foram utilizadas neste trabalho as espécies *C. albicans*^{6,39,58,79} e *L. casei*^{3,6,67}. A avaliação da colonização microbiana pelas espécies incluiu as fases de adesão e formação de biofilme sobre a superfície de discos feitos com resina acrílica Sem Adesivo (SA), com o Adesivo *Ultra Corega Creme* (AC) e com o Adesivo *Corega Fita Adesiva* (AF), de modo a avaliar qual situação, em uma simulação clínica, promove maior ou menor crescimento microbiano das espécies de *Candida* e de *Lactobacillus*, de maneira isolada e em co-cultura.

Abaixo é apresentada uma Tabela com a composição, fabricante e lote dos adesivos selecionados para este estudo.

Tabela 1 - Composição, fabricante e lote dos adesivos *Ultra Corega* Creme e *Corega Fita Adesiva*.

Adesivo	Composição	Fabricante	Lote
<u>Ultra Corega</u> <u>Creme</u>	<i>Sais de sódio/cálcio de poli (metilviniléter / ácido maleico), carboximetilcelulose, óleo mineral, vaselina</i>	STAFFORD-MILLER	R 13462
		IRELAND Limited, do grupo de Empresas GlaxoSmithKline, Youghal Road, Dungarvan, Co. Waterford, Irlanda	
<u>Corega Fita</u> <u>Adesiva</u>	<i>Carboximetilcelulose de sódio, cera monocristalina, polibutileno, polietilenoglicol</i>	GlaxoSmithKline Brasil Ltda. Estrada dos Bandeirantes, 8464 - Rio de Janeiro - RJ - CNPJ 33.247.743/0001-10.	5S0212V
		REG. ANVISA: 80141610008. Indústria Brasileira	

Fonte: Elaboração própria.

4.2.2.1 Preparo dos inóculos

As cepas microbianas utilizadas (*C. albicans* SC 5314 e *L. casei* ATCC 4646) foram mantidas congeladas a -80°C e reativadas no momento do uso em placas contendo o meio de cultura *Ágar Sangue*, pelo método da saturação, sendo em seguida incubadas a 37°C em ambiente com CO₂ a 5% por 48 horas. As placas de *Ágar Sangue* foram utilizadas porque é possível diferenciar visualmente as colônias das cepas utilizadas neste meio de cultura, permitindo assim a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Após este período, cinco colônias de cada cepa foram transferidas separadamente para meio de cultura líquido *TYE* (*Tryptone and Yeast Extract*) suplementado com 1% de glicose, e foram então incubados por 16 horas, também a 37°C e em ambiente com CO₂ a 5%, formando

desta maneira o *pré-inóculo*. A seguir, essas culturas foram diluídas 1:20 e 1:40 em meio *TYE* + 1% de glicose, e incubadas até atingirem Densidade Óptica (DO) correspondente ao meio da fase exponencial, o que foi determinado previamente através de curvas de crescimento das cepas microbianas utilizadas (DO=0,719 ±0,181 e de aproximadamente 8 horas para *L. casei*, e DO=0,97 ±0,03 e de aproximadamente 6 horas para *C. albicans*). A DO era verificada através do uso de Espectrofotômetro. As duas diluições foram feitas em cada micro-organismo para permitir que fosse escolhido um tubo por cepa, garantindo assim que a diluição com densidade óptica ideal fosse utilizada para o preparo do *inóculo*. Os tubos escolhidos foram centrifugados por 20 minutos a 4000 Rotações Por Minuto (RPM) e à temperatura de 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o mesmo volume de meio novo (*TYE* + 1% de glicose) foi adicionado, obtendo-se uma concentração microbiana de 1×10^6 UFC/mL, para o *inóculo* dos ensaios de adesão e formação de biofilmes. Foram preparados inóculos de *L. casei* apenas, *C. albicans* apenas, e de *L. casei* e *C. albicans*.

4.2.2.2 Aplicação dos adesivos

De modo a garantir maior fidelidade aos resultados obtidos, foi feita uma padronização da quantidade dos adesivos que foram aplicados sobre a superfície dos espécimes. Para o Adesivo *Ultra Corega Creme* foi padronizada a quantidade de aproximadamente 0,050 gramas do produto em cada corpo de prova, sendo esta porção aplicada e espalhada de maneira homogênea diretamente sobre a superfície do espécime, formando uma fina camada sobre a superfície^{19,23,32}. Já o Adesivo *Corega Fita Adesiva* foi recortado, umedecido em água Milli-Q esterilizada e aplicado sobre a superfície dos espécimes^{19,23,32}, sendo padronizada também a quantidade de aproximadamente 0,050 gramas do produto em cada corpo de prova (Figura 13).

Figura 13 - Grupos experimentais com Adesivo *Ultra Corega Creme* (AC), Adesivo *Corega Fita Adesiva* (AF) e resina acrílica Sem Adesivo (SA).



Fonte: Elaboração própria.

O processo de aplicação dos adesivos aos espécimes já previamente desinfetados por meio de exposição à luz ultravioleta foi feito no interior da câmara de fluxo laminar vertical, garantindo ambiente asséptico. Após a aplicação, todos os espécimes foram novamente submetidos à exposição em luz ultravioleta por 20 minutos, para desinfecção dos adesivos aplicados.

4.2.2.3 Coleta e preparo da saliva

Nesta pesquisa foi utilizada saliva natural para incubação dos espécimes de resina acrílica, de modo a simular uma condição real. O presente trabalho está de acordo com aspectos éticos através de aprovação no site da *Plataforma Brasil*, sob registro CAAE: 36069714.7.0000.5416 (ANEXO A).

Foi coletada saliva estimulada de dois voluntários que não haviam se alimentado em um período de pelo menos duas horas antes da coleta, nem utilizado creme dental com princípio ativo diferente de flúor ou feito uso de bochechos com substâncias antissépticas. A saliva foi estimulada pela mastigação de um pedaço de parafilme pelos voluntários. Foi coletado um total de 200 mL de saliva, em tubos de polipropileno. A saliva foi então misturada com tampão de adsorção (Tampão AB – 0,05 M KCl; 0,02 M KPO₄; 0,02 M CaCl₂; 0,02 M MgCl₂) em uma proporção de 1:1 (v/v) e foi adicionado 0,1 M PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma) à uma relação de 1:1000 (0,1 mM PMSF na concentração final). Em seguida, o conteúdo

foi centrifugado por 10 minutos a 4000 RPM e 4°C. O sobrenadante foi recolhido (saliva totalmente clarificada) e filtrado usando filtro com poros de 0,22 µm (*Sistema de filtração Rapid Flow, 500 mL, Nalgene* - Figura 14). A saliva permaneceu armazenada a -80°C até sua utilização.

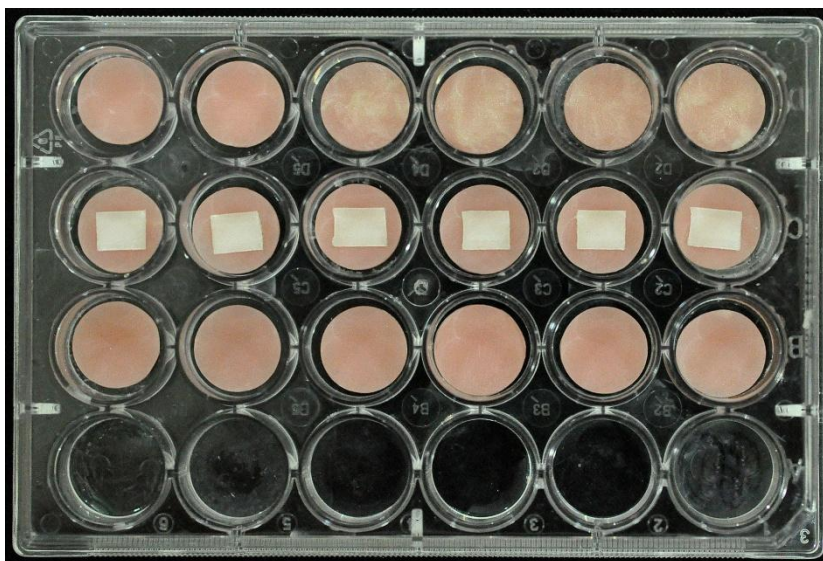
Figura 14 - Sistema de filtração utilizado para saliva.



Fonte: Elaboração própria.

Os espécimes de todas as situações experimentais (AC, AF e SA) foram acondicionados, com auxílio de pinça esterilizada, em placas de microtitulação de 24 poços, sendo 1 disco por poço (Figura 15). Estes foram pré-incubados em saliva total esterilizada por filtração, permanecendo por 30 minutos à 37°C para formação de película salivar (a qual possui componentes necessários para a colonização por micro-organismos orais). Um volume de 1 mL de saliva esterilizada foi utilizado para cada poço da placa. Após este período, a saliva foi removida e os discos foram enxaguados com solução salina (NaCl 0,89%).

Figura 15 - Discos de todas as situações experimentais (AC, AF e AS) acondicionados em placa de microtitulação de 24 poços.

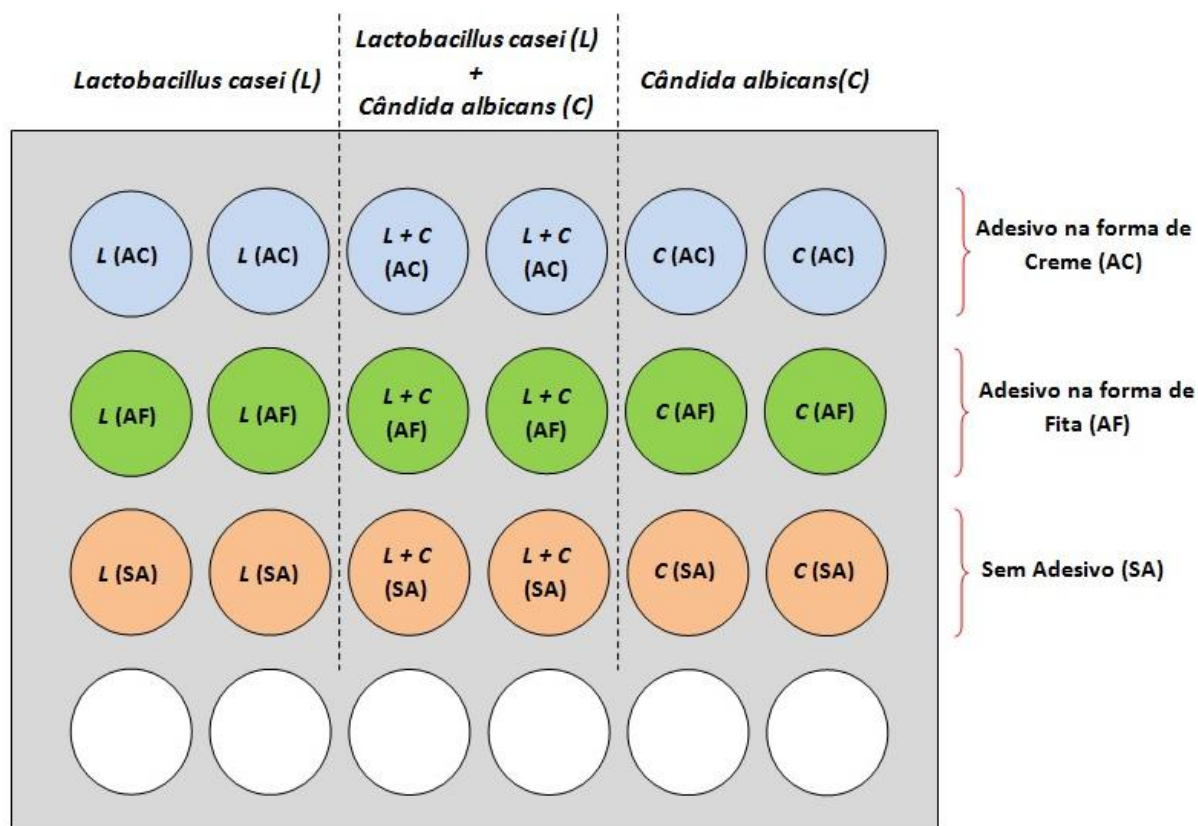


Fonte: Elaboração própria.

4.2.2.4 Ensaios de Adesão

Um volume de 1,0 mL de cada *inóculo* (1×10^6 UFC/mL, preparado como descrito anteriormente) foi transferido para cada poço da microplaca, sendo os inóculos com diferentes grupos de micro-organismos divididos segundo ilustrado na Figura 16.

Figura 16 - Ilustração da microplaca de 24 poços com o posicionamento dos discos para colonização microbiana (por grupo experimental e espécies microbianas).

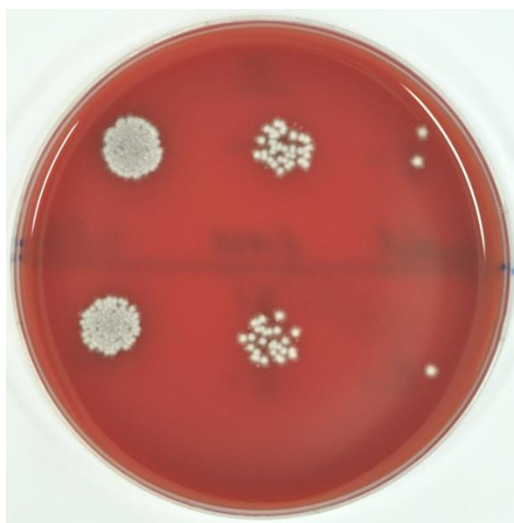


Fonte: Elaboração própria.

A placa foi incubada por 1 hora e meia (à temperatura de 37°C e em ambiente com CO₂ a 5%), e então os discos foram lavados gentilmente com solução salina (0,89% NaCl). Em seguida, iniciou-se o processamento das amostras para a quantificação de cada micro-organismo aderido nas superfícies, através da contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL.

Cada disco foi transferido individualmente para tubos de ensaio de vidro estéreis com 2 mL de solução salina (0,89% NaCl) em seu interior, utilizando-se pinça clínica estéril e em ambiente asséptico. Os tubos de ensaio foram submetidos à banho ultrassônico por 11 minutos para remoção das células aderidas, seguido de diluição seriada da suspensão microbiana por disco. Foram feitas diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻³. As diluições foram semeadas em placas de Ágar Sangue pela técnica da gota, e estas foram incubadas por 48 horas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂, sendo em seguida o número de UFC quantificado (Figura 17).

Figura 17 - Placa de Ágar Sangue com desenvolvimento de colônias proveniente de Ensaio de adesão, em 3 diferentes diluições seriadas.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.2.5 Ensaios de formação de Biofilme

Para avaliar a consequente formação de biofilme após a adesão microbiana, após o período de incubação por 1 hora e meia (à temperatura de 37°C e em ambiente com CO₂ a 5%) foi feita a troca do meio de cultura (TYE+1% glicose) e os discos com os micro-organismos aderidos permaneceram incubados por mais 24 horas. Em seguida, os discos com biofilmes foram processados do mesmo modo descrito para os ensaios de adesão. Foi adotado um período de formação de Biofilme de 24 horas porque considera-se que nenhum usuário de adesivos permaneça com o produto em sua boca por um período superior a esse.

Cada disco foi transferido individualmente para tubos de ensaio de vidro estéreis com 2 mL de solução salina (0,89% NaCl) em seu interior, utilizando-se pinça clínica estéril e em ambiente asséptico. Os tubos de ensaio foram submetidos à banho ultrassônico por 11 minutos para remoção das células de biofilme, seguido de diluição seriada da suspensão microbiana por disco. Foram feitas diluições seriadas de 10⁻² a 10⁻⁴. As diluições foram semeadas em placas de Ágar Sangue pela técnica da gota, e estas foram incubadas por 48 horas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂, sendo em seguida o número de UFC quantificado (Figura 18).

Figura 18 - Placa de Ágar Sangue com desenvolvimento de colônias proveniente de Ensaio de formação de biofilme, em 3 diferentes diluições seriadas.



Fonte: Elaboração própria.

Foram realizadas 2 replicatas por condição experimental em cada microplaca, considerando os diferentes inóculos de micro-organismos, os adesivos testados e os ensaios propostos (*Adesão* e *Biofilme*). Ao todo foram realizados 4 experimentos em ocasiões distintas, desta maneira totalizando um *N* de 144 e um *n* de 8 espécimes por condição experimental.

4.2.2.6 Caracterização dos espécimes por condição experimental através de análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a finalidade de caracterizar cada uma das condições experimentais, após a finalização dos ensaios de adesão e de formação de biofilme promoveu-se o processamento das amostras para observar o padrão de distribuição das células e a arquitetura do biofilme formado em cada condição experimental. Para MEV, após o período de incubação nas distintas condições experimentais (*Adesão*: 1 hora e meia; *Biofilme*: 24 horas), foi feita a remoção das células não aderidas por lavagem com solução salina (0,89% NaCl) e em seguida foram realizados procedimentos para a fixação das células aderidas por meio da imersão dos discos em paraformaldeído 4% por 1 hora e, subsequentemente, em solução alcoólica a 70%, 80%, 90% e 99%,

por 20 minutos cada. A lavagem e as imersões foram feitas através da troca dos espécimes de placa, com grande cuidado para não remover as células e assim promover a melhor fixação possível. Tais procedimentos foram feitos no interior da câmara de fluxo laminar vertical.

Após o processo de fixação das células aderidas, os espécimes foram mantidos em dessecador por 5 dias para total evaporação de qualquer umidade presente nas amostras.

Apesar de análises terem sido feitas nos espécimes nas situações experimentais de *Adesão* e *Biofilme*, as amostras de *Adesão* foram prejudicadas por problemas técnicos durante o processamento, de modo que os micro-organismos não puderam ser encontrados sobre a superfície dos espécimes mesmo após repetição do protocolo, provavelmente porque se deslocaram da superfície durante as etapas de lavagem e enxágue. Assim, nas amostras de *Biofilme*, procurou-se selecionar regiões representativas do que era encontrado de maneira geral em cada superfície dos espécimes. Inicialmente foram analisados 36 espécimes em MEV, no entanto como os espécimes de *Adesão* não puderam ser aproveitados, a amostra por fim contou com 18 espécimes (N=18), sendo 2 espécimes por condição experimental (n=2).

4.3 Análise Estatística

Para a análise de contagem de UFC (por superfície), inicialmente os dados obtidos foram tabulados e as médias, desvio-padrão e coeficiente de variação foram calculados. Os dados foram transformados em $\log_{10}$ para melhor visualização dos resultados. Foi verificada a distribuição normal dos dados, e por isso foi feita análise de variância através de ANOVA dois fatores. Como foi indicada diferença significativa entre os grupos, o teste de *Tukey* para comparações múltiplas foi empregado.

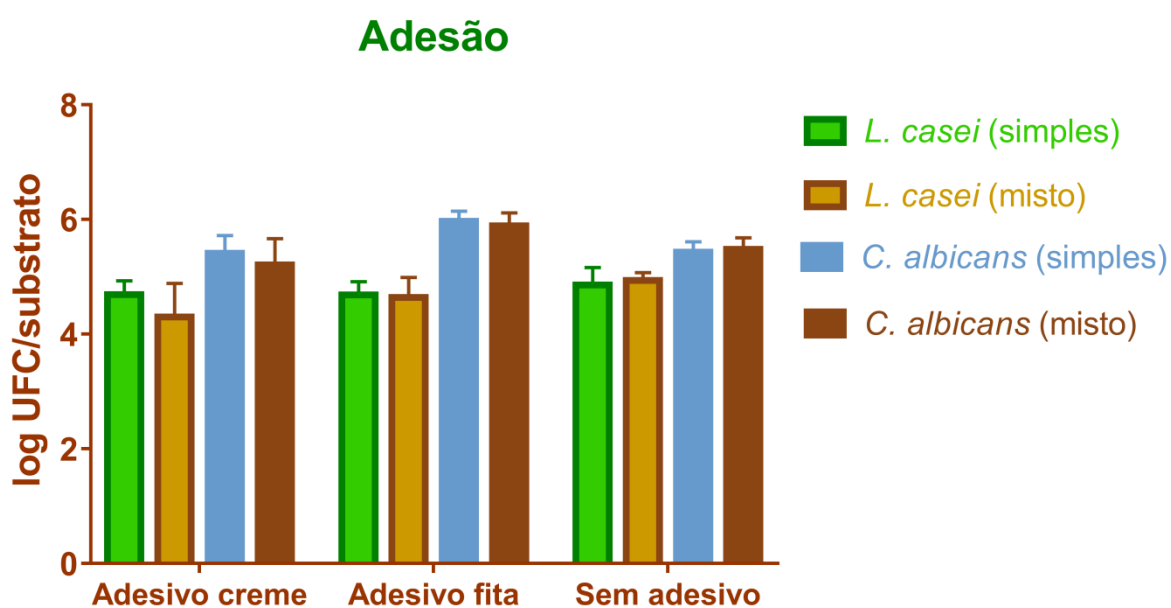
Um nível de significância de 0,05 foi obedecido para todas as comparações realizadas, independente da variável. Todos os testes foram conduzidos por meio do programa *GraphPad Prism 7* (versão 7.03).

5 RESULTADOS

5.1 Contagem de UFC

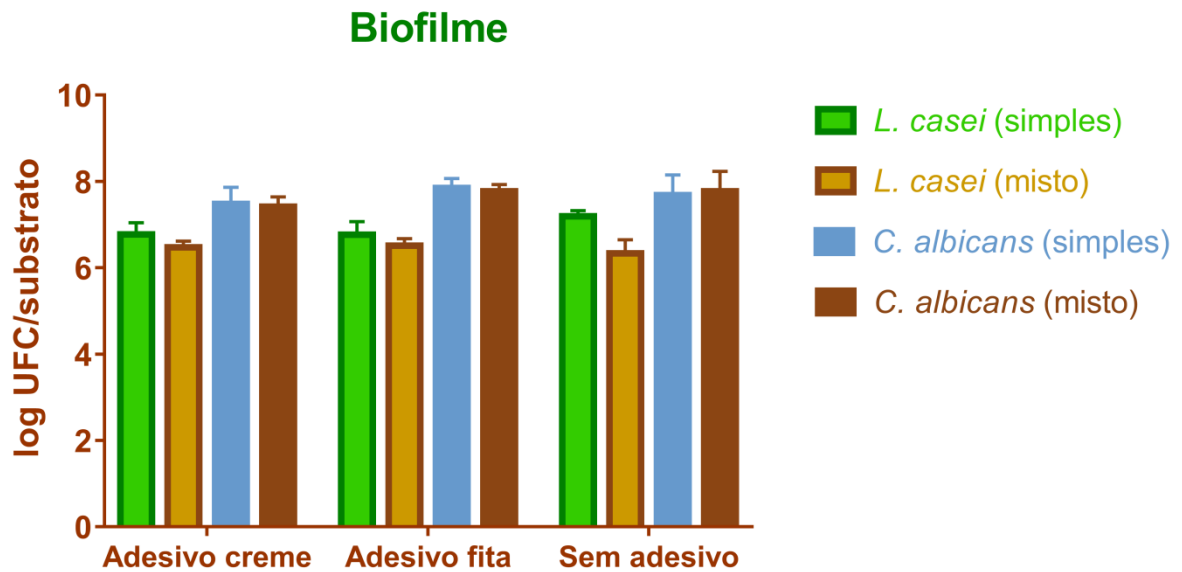
Os dados referentes à estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação) para as situações experimentais de Adesão e Biofilme foram tabulados (APÊNDICES A E B), e são representados pelas Figuras 19 e 20.

Figura 19 - Dados descritivos da contagem de UFC durante os experimentos de Adesão, nas diferentes situações experimentais.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 - Dados descritivos da contagem de UFC durante os experimentos de Biofilme, nas diferentes situações experimentais.



Fonte: Elaboração própria.

Após aplicação do teste de *Tukey* para comparações múltiplas, foi detectada diferença estatisticamente significativa entre vários grupos, de acordo com as situações experimentais (Tabelas 2, 3, 4 e 5):

Tabela 2 - Comparações entre as diferentes situações experimentais nos testes de **Adesão**, de acordo com as espécies de **micro-organismos**.

Micro-organismo	Comparação	Valor de <i>p</i>
<i>L. casei</i> (simples)	Adesivo Creme X Adesivo Fita	0,9983
	Adesivo Creme X Sem Adesivo	0,5278
	Adesivo Fita X Sem Adesivo	0,4940
<i>L. casei</i> (misto)	Adesivo Creme X Adesivo Fita	0,0796
	Adesivo Creme X Sem Adesivo	0,0003*
	Adesivo Fita X Sem Adesivo	0,1392
<i>C. albicans</i> (simples)	Adesivo Creme X Adesivo Fita	0,0016*
	Adesivo Creme X Sem Adesivo	0,9905
	Adesivo Fita X Sem Adesivo	0,0024*
<i>C. albicans</i> (misto)	Adesivo Creme X Adesivo Fita	<0,0001*
	Adesivo Creme X Sem Adesivo	0,1910
	Adesivo Fita X Sem Adesivo	0,0264*

*Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

Observa-se que *L. casei* (misto) se aderiu melhor na situação *Sem Adesivo* do que quando o *Adesivo Creme* foi utilizado, porém não ocorreram diferenças na quantidade de células aderidas entre os dois adesivos testados. Já *C. albicans* (simples) se aderiu em maior quantidade quando o *Adesivo Fita* foi utilizado do que quando o *Adesivo Creme* ou nenhum adesivo foi utilizado. Quando *C. albicans* se desenvolveu em conjunto com *L. casei*, da mesma maneira, foi observado maior adesão do fungo quando o *Adesivo Fita* foi empregado do que quando o *Adesivo Creme* ou nenhum adesivo foi utilizado.

Deste modo, observou-se que *L. casei*, de maneira geral, não difere sua taxa de adesão quando adesivos são utilizados. Em uma única exceção, quando cultivado de maneira mista com *C. albicans*, *L. casei* aderiu mais *Sem Adesivo* do que quando o *Adesivo Creme* foi empregado. Ainda, observou-se que *C. albicans* tanto simples quanto misto adere mais quando cultivada em *Adesivo Fita* do que nas outras situações.

Tabela 3 - Comparações entre as diferentes situações experimentais nos testes de **Adesão**, de acordo com as **superfícies** testadas.

Superfície	Comparação	Valor de <i>p</i>
Adesivo Creme	<i>L. casei</i> (simples) X <i>L. casei</i> (misto)	0,0643
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,0073*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (misto)	<0,0001*
	<i>C. albicans</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,5614
Adesivo Fita	<i>L. casei</i> (simples) X <i>L. casei</i> (misto)	0,9924
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (misto)	<0,0001*
	<i>C. albicans</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,9583
Sem Adesivo	<i>L. casei</i> (simples) X <i>L. casei</i> (misto)	0,9577
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (simples)	0,0024*
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,0008*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (simples)	0,0114*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,0043*
	<i>C. albicans</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,9889

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

Considerando as superfícies dos espécimes, em todas as situações (*Adesivo Creme*, *Adesivo Fita* e *Sem Adesivo*), *C. albicans* tanto simples quanto misto aderiu mais quando comparado com *L. casei* simples ou misto. Ainda, observou-se que em todas as situações (*Adesivo Creme*, *Adesivo Fita* e *Sem Adesivo*), sempre que uma mesma espécie foi comparada em sua situação simples e misto, não foi observada diferença estatisticamente significativa, refletindo assim que nenhuma relação de sinergismo ou antagonismo foi observada entre as diferentes espécies, nas análises de Adesão.

Tabela 4 - Comparações entre as diferentes situações experimentais nos testes de **Biofilme**, de acordo com as espécies de **micro-organismos**.

Micro-organismo	Comparação	Valor de <i>p</i>
<i>L. casei</i> (simples)	Adesivo Creme X Adesivo Fita	0,9967
	Adesivo Creme X Sem Adesivo	0,0156*
	Adesivo Fita X Sem Adesivo	0,0126*
<i>L. casei</i> (misto)	Adesivo Creme X Adesivo Fita	0,9620
	Adesivo Creme X Sem Adesivo	0,6202
	Adesivo Fita X Sem Adesivo	0,4569
<i>C. albicans</i> (simples)	Adesivo Creme X Adesivo Fita	0,0369*
	Adesivo Creme X Sem Adesivo	0,3408
	Adesivo Fita X Sem Adesivo	0,5163
<i>C. albicans</i> (misto)	Adesivo Creme X Adesivo Fita	0,0473*
	Adesivo Creme X Sem Adesivo	0,0479*
	Adesivo Fita X Sem Adesivo	>0,9999

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

Nas análises de formação de Biofilme, *L. casei* (simples) se desenvolveu mais na situação *Sem Adesivo* do que quando o *Adesivo Creme* ou *Adesivo Fita* foram utilizados. Em seu cultivo misto com *C. albicans*, não foi observada diferença em seu desenvolvimento entre as situações *Sem Adesivo* ou com os dois adesivos testados.

C. albicans (simples) se desenvolveu mais quando o *Adesivo Fita* foi utilizado do que quando o *Adesivo Creme* foi empregado, no entanto não observou-se diferença entre as situações *Adesivo Fita* e *Sem Adesivo*. Quando cultivado em conjunto com *L. casei*, da mesma maneira foi observado menor crescimento do fungo quando o *Adesivo Creme* foi empregado, não havendo diferença entre o desenvolvimento nas situações *Adesivo Fita* e *Sem Adesivo*.

Tabela 5 - Comparações entre as diferentes situações experimentais nos testes de **Biofilme**, de acordo com as **superfícies** testadas.

Superfície	Comparação	Valor de <i>p</i>
Adesivo Creme	<i>L. casei</i> (simples) X <i>L. casei</i> (misto)	0,1854
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,0002*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (misto)	<0,0001*
	<i>C. albicans</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,9753
Adesivo Fita	<i>L. casei</i> (simples) X <i>L. casei</i> (misto)	0,3366
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (misto)	<0,0001*
	<i>C. albicans</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,9544
Sem Adesivo	<i>L. casei</i> (simples) X <i>L. casei</i> (misto)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (simples)	0,0071*
	<i>L. casei</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,0011*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (simples)	<0,0001*
	<i>L. casei</i> (misto) X <i>C. albicans</i> (misto)	<0,0001*
	<i>C. albicans</i> (simples) X <i>C. albicans</i> (misto)	0,9388

*Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

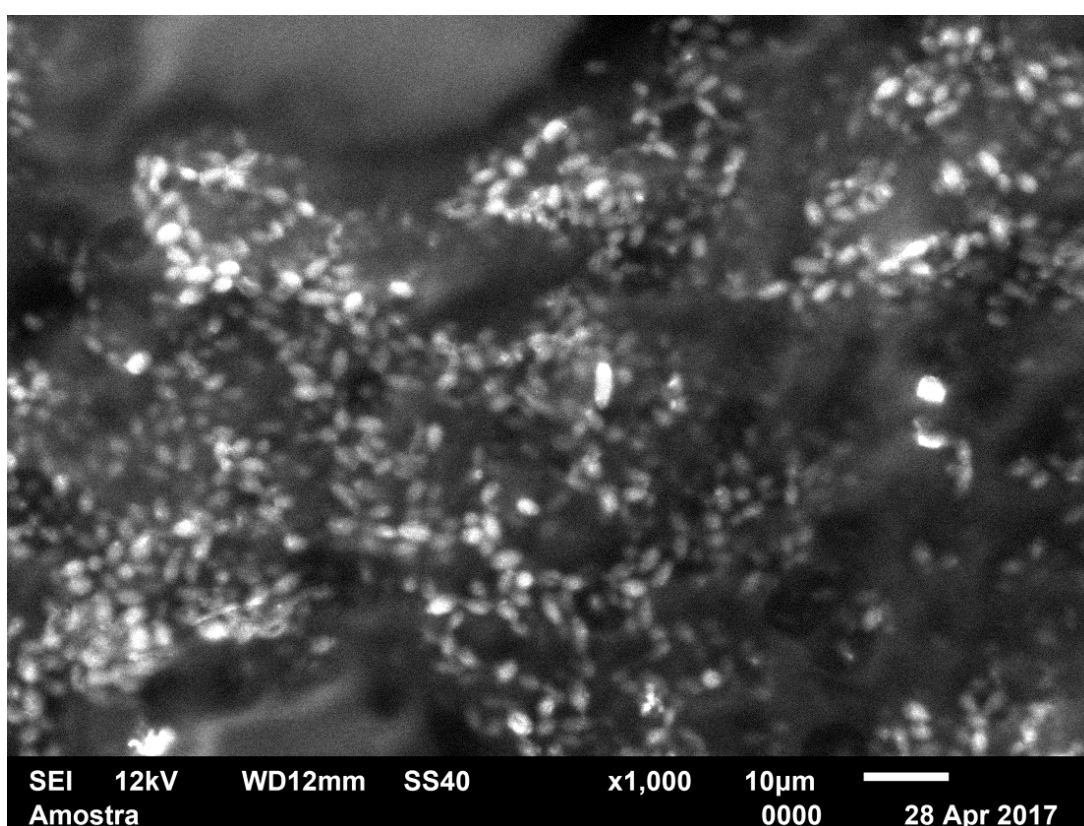
Considerando as superfícies dos espécimes, em todas as situações (*Adesivo Creme*, *Adesivo Fita* e *Sem Adesivo*), *C. albicans* tanto simples quanto misto se desenvolveu mais quando comparada com o *L. casei* simples ou misto.

Também, observou-se que em quase todas as situações (*Adesivo Creme*, *Adesivo Fita* e *Sem Adesivo*), quando uma mesma espécie foi comparada em sua situação simples e misto, não foi observada diferença estatisticamente significante, refletindo assim que quase nenhuma relação de sinergismo ou antagonismo foi observada entre as diferentes espécies. A única exceção foi a espécie *L. casei* em seu cultivo na situação *Sem Adesivo*, onde observa-se maior crescimento em simples do que em cultivo misto com *C. albicans*.

5.2 Caracterização por MEV

Como etapa complementar à contagem de UFC, a análise em MEV teve como objetivo caracterizar as amostras nas diferentes situações experimentais. Para padronização, imagens que objetivaram encontrar espécies de *C. albicans* foram feitas com uma aproximação de 1000 vezes (Figuras 21, 22, 23, 27, 29 e 31), enquanto as imagens onde o objetivo era a visualização de espécies de *L. casei* foram feitas com aproximação de 2500 vezes (Figuras 24, 25, 26, 28, 30 e 32).

Figura 21 - *C. albicans* simples - Adesivo Creme.

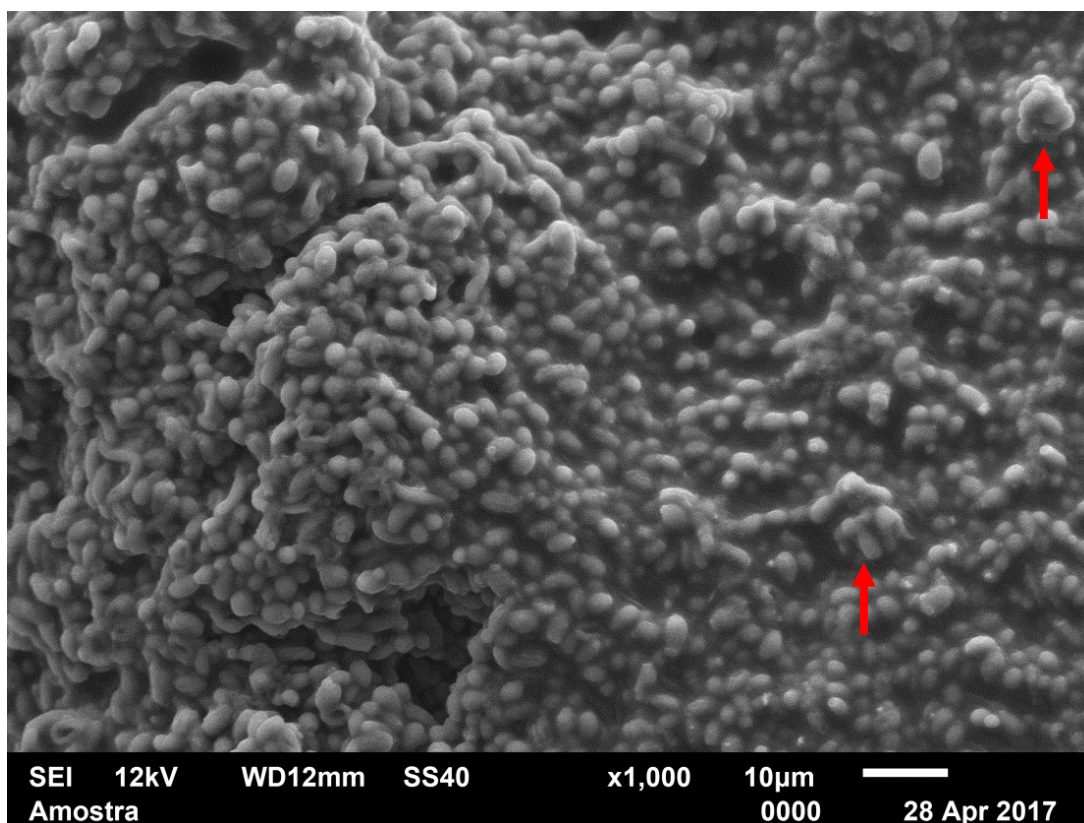


Fonte: Elaboração própria.

As imagens relativas às espécies com *Adesivo Creme* sobre sua superfície, de um modo geral, apresentaram-se com padrão “embaçado” (Figuras 21, 24, 27 e 28). Isto ocorreu provavelmente devido aos componentes deste adesivo, mais especificamente o óleo mineral e a vaselina, componentes com característica hidratante e lubrificante, que não são encontrados na composição do *Adesivo Fita*.

Observa-se na imagem apenas o formato de leveduras (células ovaladas), e regiões sem desenvolvimento microbiano (Figura 21).

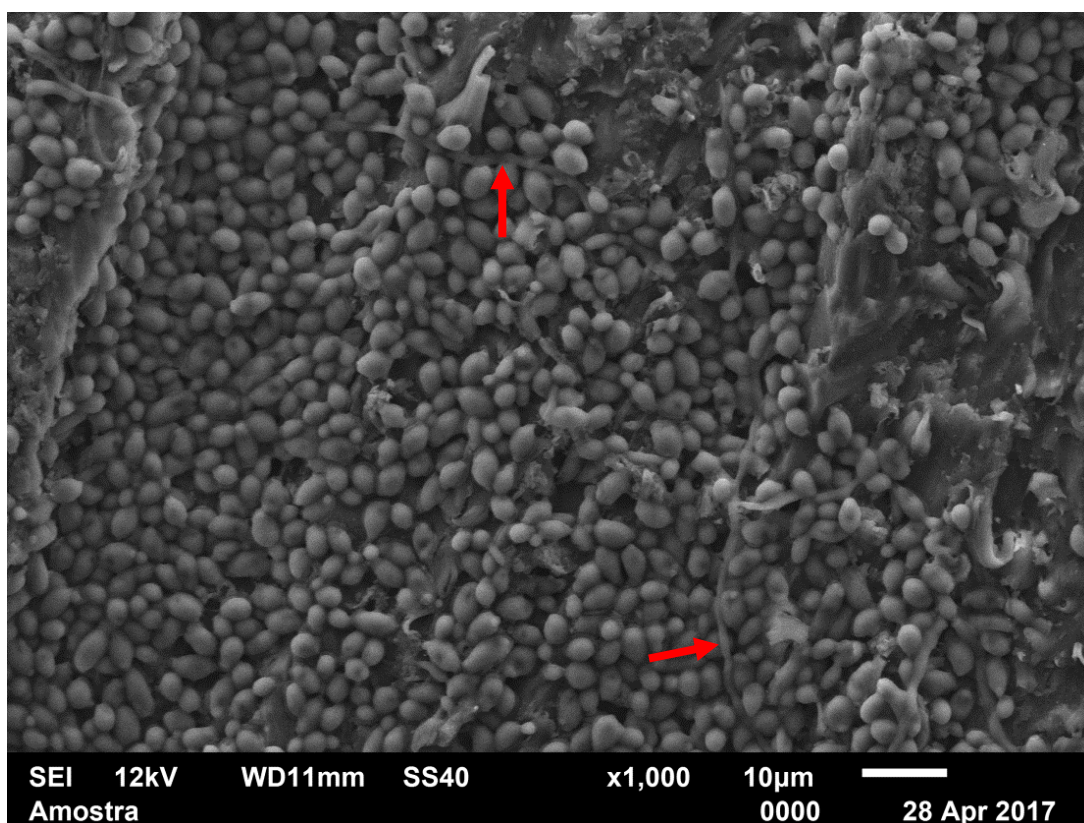
Figura 22 - *C. albicans* simples - Adesivo Fita.



Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 22 observa-se leveduras de *C. albicans* envoltos por uma “matriz”, que é o *Adesivo Fita*, não sendo observado padrão embaçado como nas imagens de superfícies com *Adesivo Creme* (Figuras 21, 24, 27 e 28). Nota-se os micro-organismos aglomerados em algumas regiões (setas vermelhas), caracterizando áreas sugestivas de formação de micro-colônias. Quase não se observa regiões sem desenvolvimento microbiano, o que corrobora com os resultados da contagem de UFC (maior desenvolvimento de *C. albicans* simples na superfície com *Adesivo Fita* do que na superfície com *Adesivo Creme*).

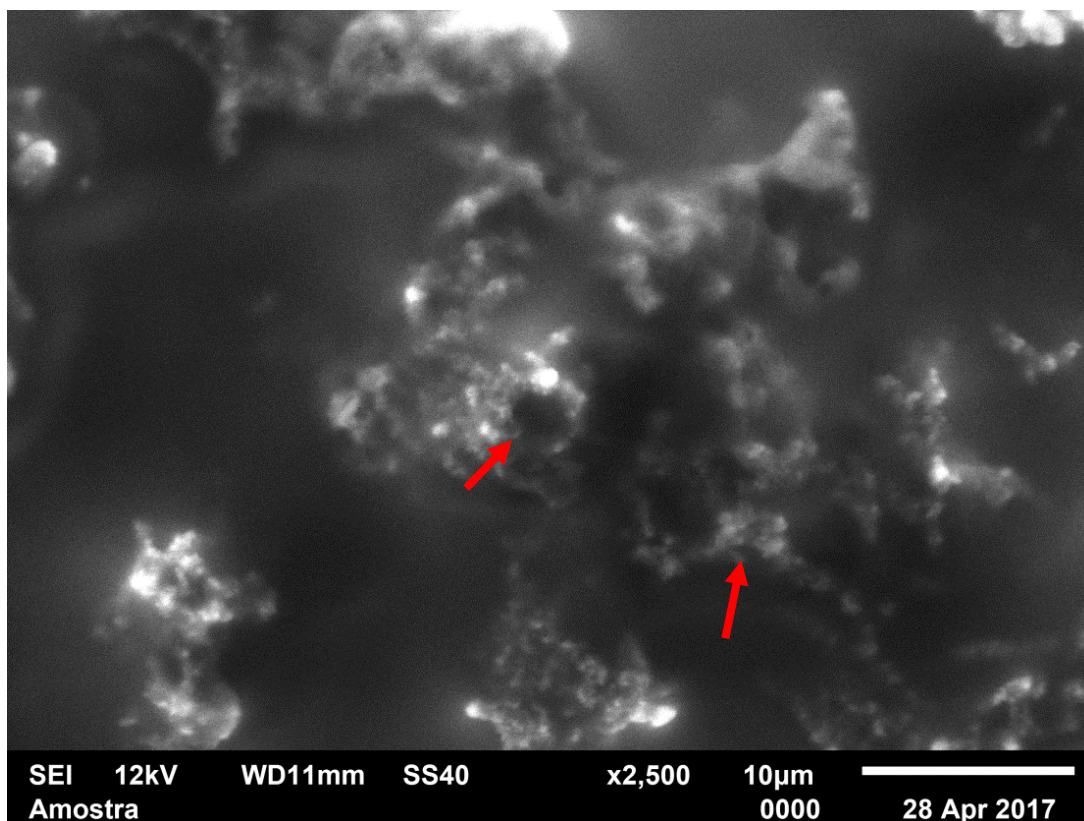
Figura 23 - *C. albicans* simples - Sem Adesivo.



Fonte: Elaboração própria.

A maioria das células observadas estão em formato de leveduras, porém também observa-se alguns prolongamentos (possivelmente hifas ou pseudo-hifas, indicadas por setas vermelhas, Figura 23). Também são observadas áreas sem desenvolvimento microbiano.

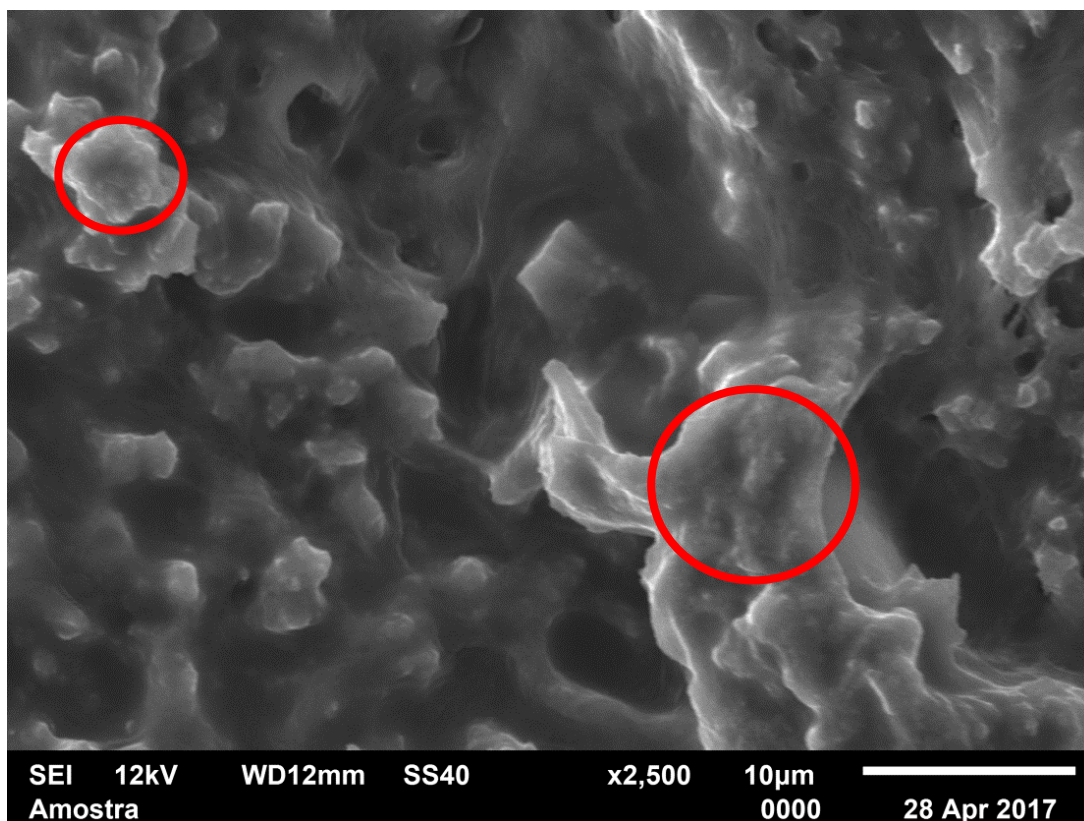
Figura 24 - *L. casei* simples - *Adesivo Creme*.



Fonte: Elaboração própria.

Observa-se o padrão “embaçado” característico das amostras com *Adesivo Creme*, sendo difícil visualizar a morfologia das células bacterianas apesar da aproximação de 2500 vezes, embora seja possível observar aglomerados (microcolônias - setas vermelhas, Figura 24). Ainda, é possível notar regiões sem desenvolvimento bacteriano.

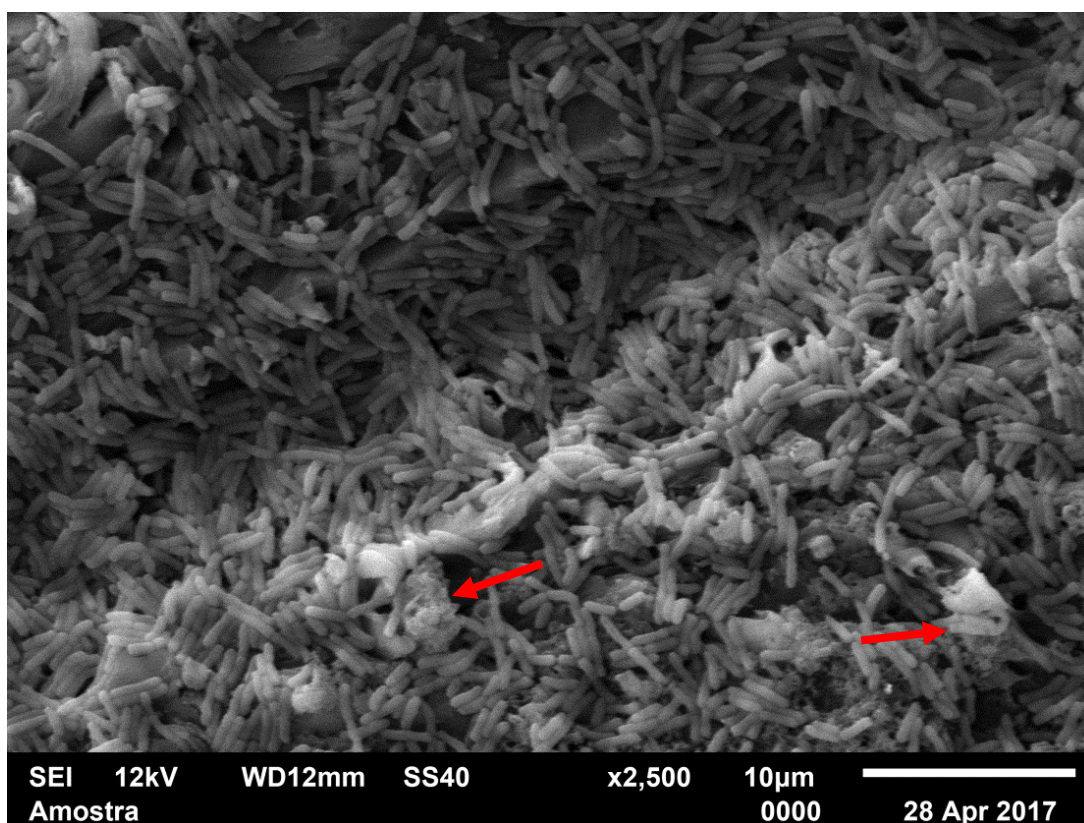
Figura 25 - *L. casei* simples - *Adesivo Fita*.



Fonte: Elaboração própria.

Para *L. casei* simples, não é possível observar células definidas também na superfície com *Adesivo Fita*, mas há áreas com aspecto "rugoso" (indicadas por círculos vermelhos), onde é possível que existam bactérias "encobertas" pelo adesivo, subsuperficialmente (Figura 25).

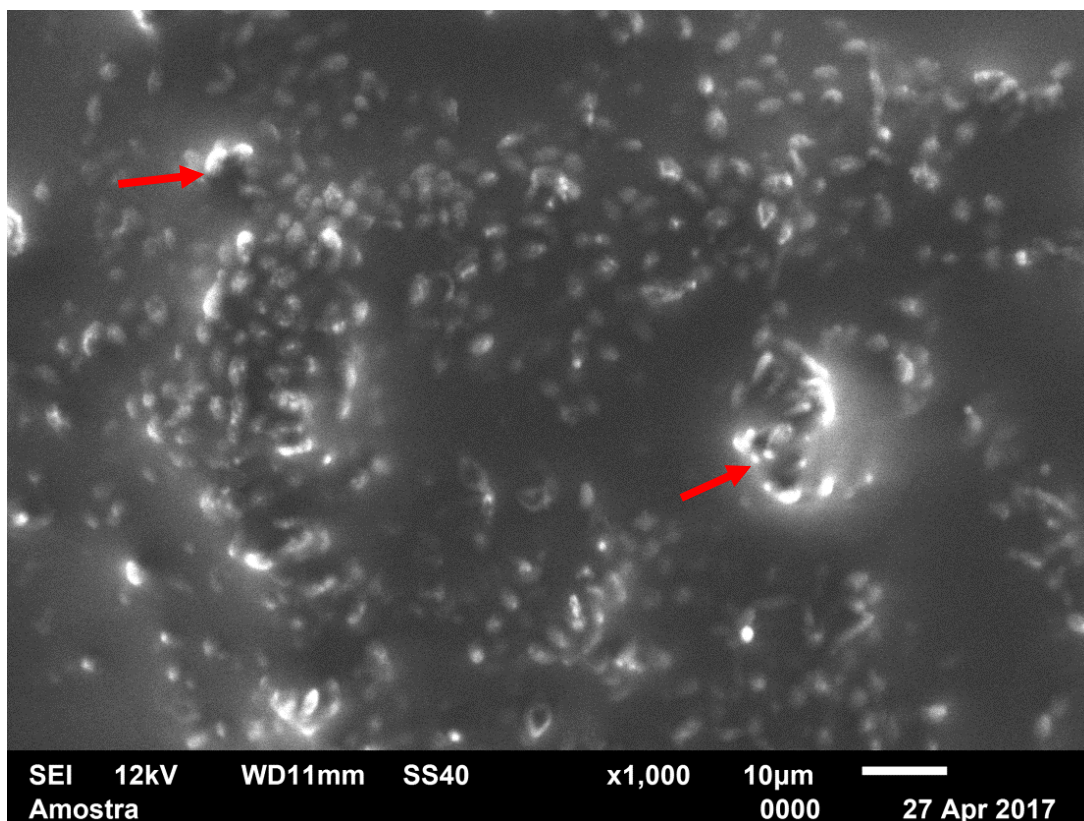
Figura 26 - *L. casei* simples - Sem Adesivo.



Fonte: Elaboração própria.

Para *L. casei* cultivado sobre substrato sem adesivo, observa-se nitidamente as células bacterianas organizadas como um “carpete” sobre a superfície, havendo regiões mais “altas” e mais “baixas” que podem ser visualizadas desta maneira devido à rugosidade superficial do material (Figura 26). Ocorrem ainda áreas com matriz extracelular (visualizadas como uma “rede” de material polimérico encobrindo as células - setas vermelhas). Corroborando com os dados encontrados relativos à contagem de UFC, observa-se maior concentração celular na imagem da superfície dos espécimes *Sem Adesivo* do que quando os *Adesivos Creme* ou *Fita* foram utilizados, apesar da dificuldade de visualização desses dois últimos.

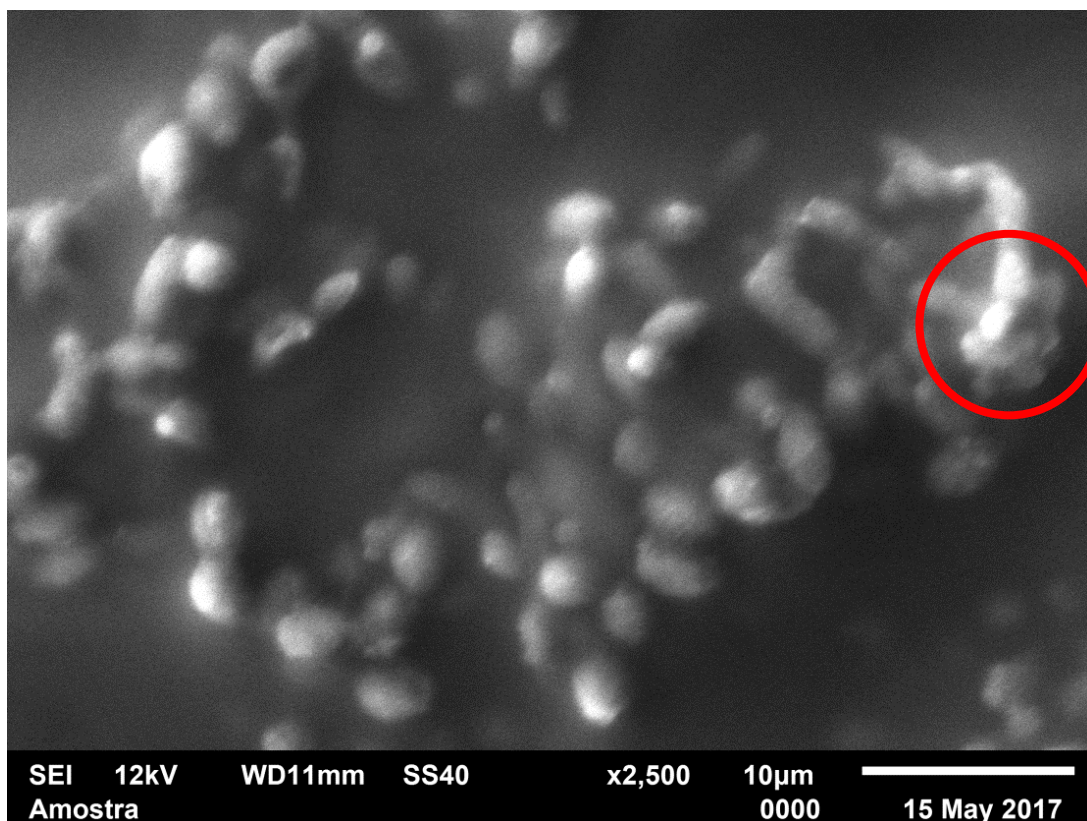
Figura 27 - *C. albicans* misto - *Adesivo Creme* (aproximação de 1000 vezes).



Fonte: Elaboração própria.

Imagem apresenta-se também com aspecto “embaçado”. Observa-se células sugestivas de leveduras e inclusive microcolônias (setas vermelhas, Figura 27). Há áreas sem desenvolvimento microbiano.

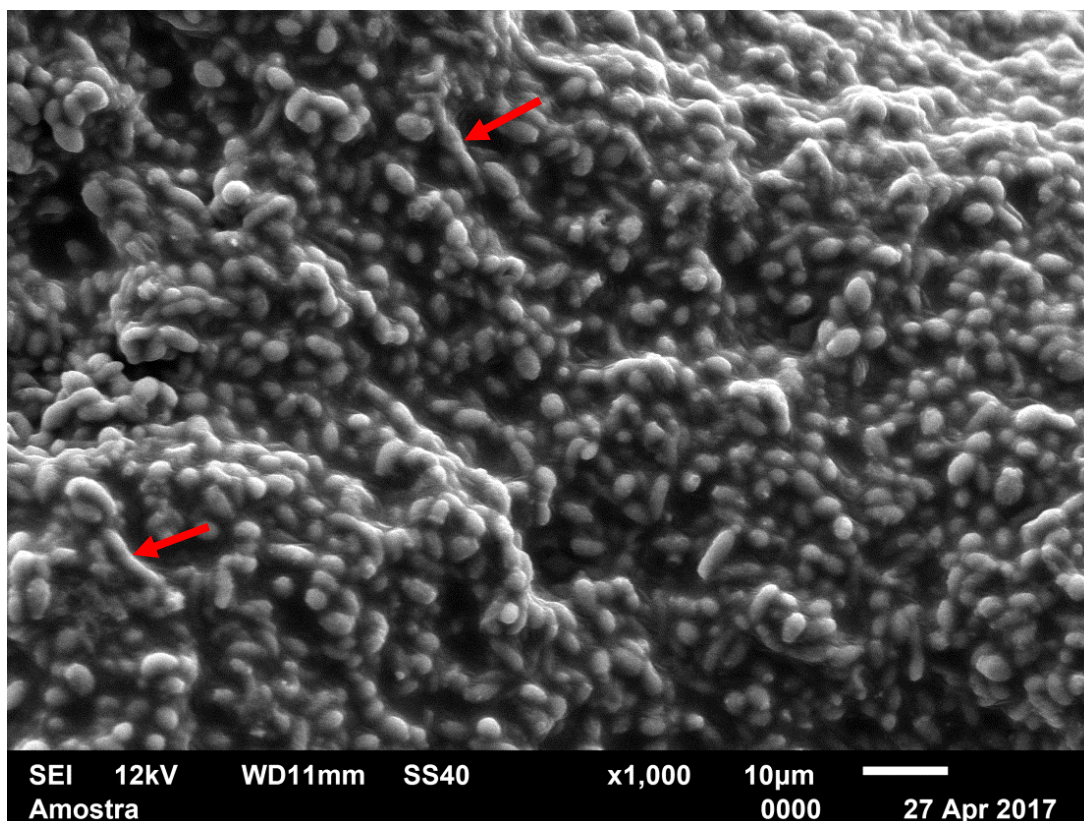
Figura 28 - *L. casei* misto - *Adesivo Creme* (aproximação de 2500 vezes).



Fonte: Elaboração própria.

Não é possível identificar *L. casei* mesmo neste aumento (Figura 28). A imagem mantém o padrão “embaçado” característico das imagens com *Adesivo Creme*. Apenas células do tipo leveduras são observadas. É possível identificar micro-colônia na imagem apresentada (círculo vermelho).

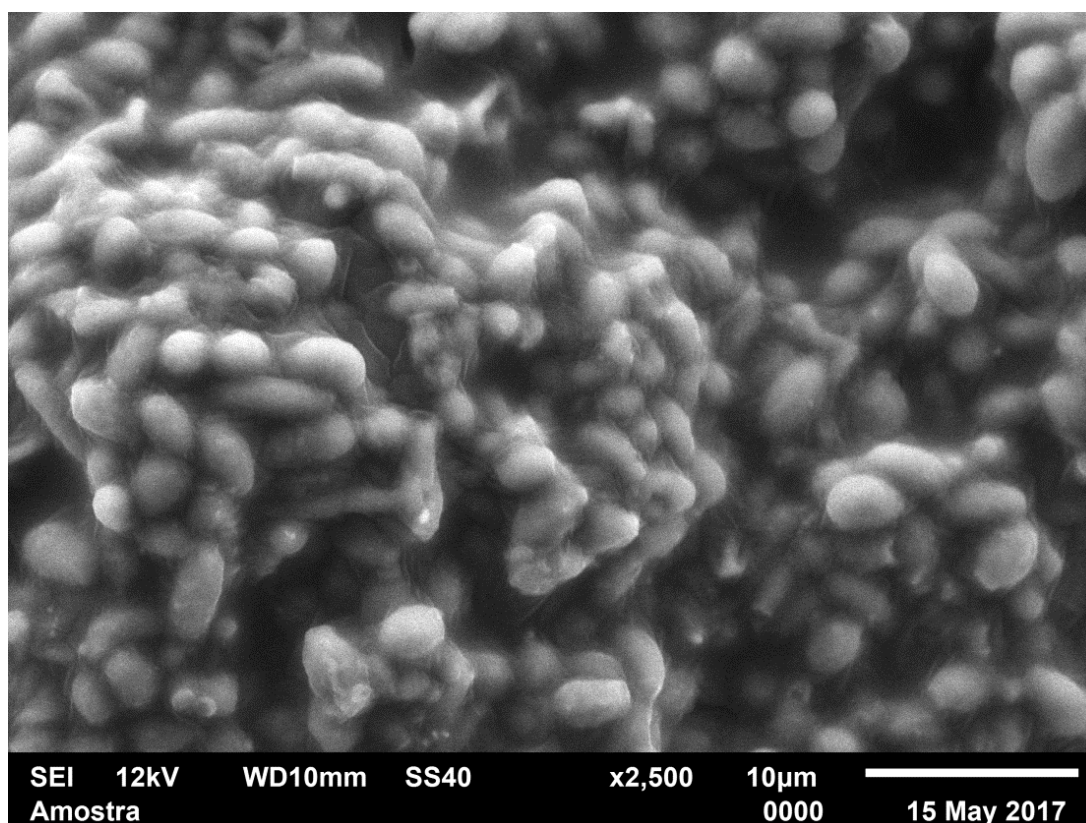
Figura 29 - *C. albicans* misto - *Adesivo Fita* (aproximação de 1000 vezes).



Fonte: Elaboração própria.

É possível visualizar leveduras envoltas pela “matriz” (*Adesivo Fita*), havendo também alguns prolongamentos em regiões isoladas (sugestivos de formação de hifas, indicados por setas vermelhas, Figura 29). Observa-se ainda maior quantidade de células em relação à imagem feita com *Adesivo Creme*, o que corrobora com os dados de contagem de população microbiana.

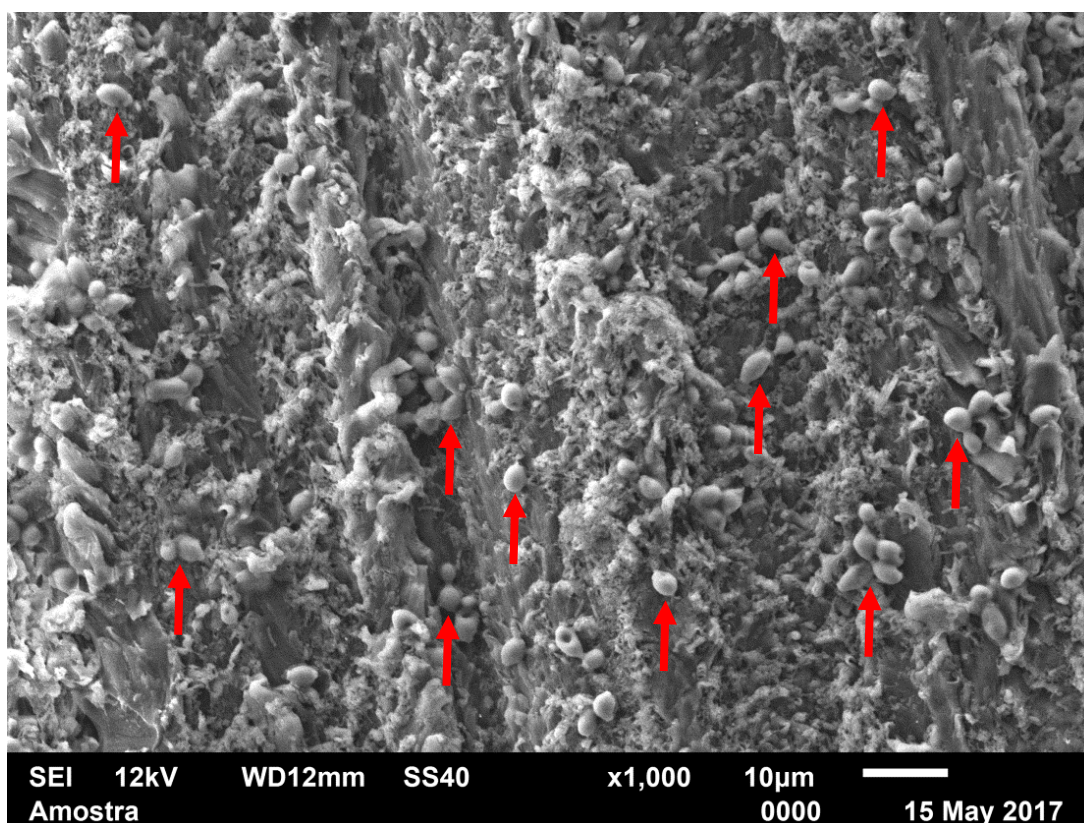
Figura 30 - *L. casei* misto - Adesivo Fita (aproximação de 2500 vezes).



Fonte: Elaboração própria.

Apesar da maior aproximação, não é possível observar células de *L. casei* na Figura 30, provavelmente devido ao tamanho das bactérias, que se encontram “encobertas” pelo adesivo. Apenas leveduras são identificadas, seguindo o mesmo padrão observado na aproximação de 1000 vezes mostrado na Figura 29.

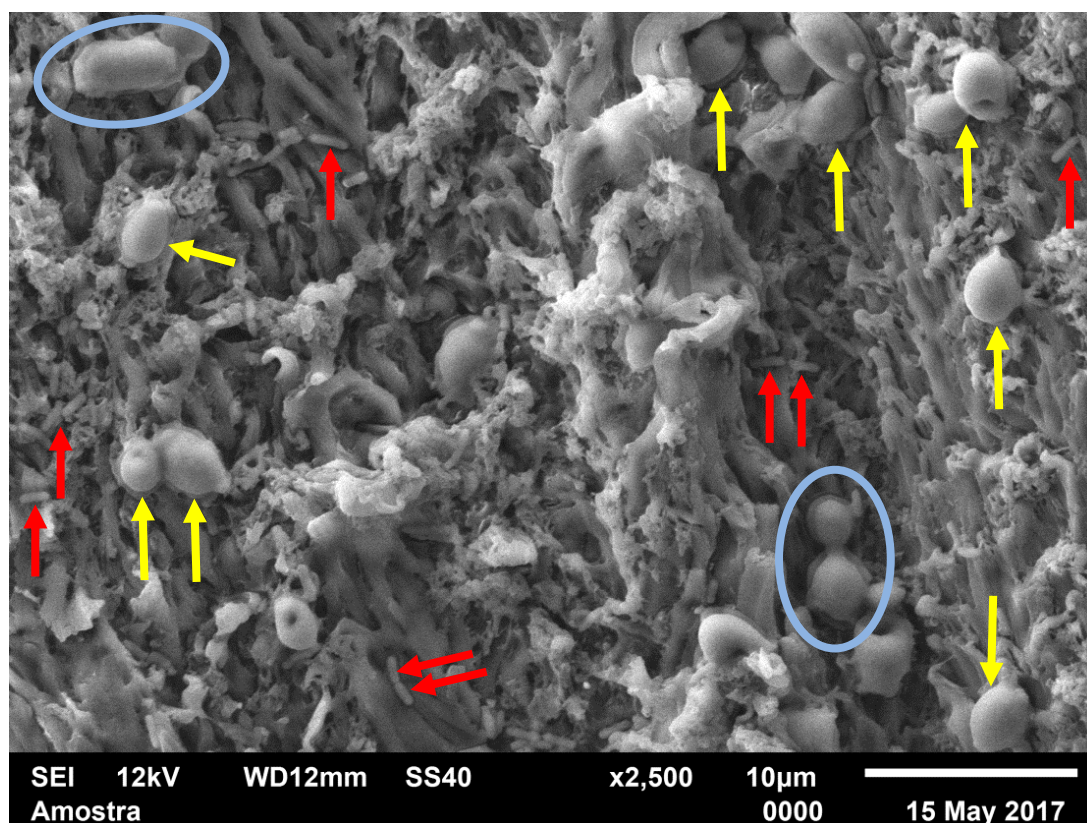
Figura 31 - *C. albicans* misto - Sem Adesivo (aproximação de 1000 vezes).



Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 31, observa-se leveduras em regiões isoladas (algumas estão indicadas por setas vermelhas), havendo também áreas sem colonização microbiana.

Figura 32 - *L. casei* misto - Sem Adesivo (aproximação de 2500 vezes).



Fonte: Elaboração própria.

Nesta aproximação é possível a visualização de *L. casei* (setas vermelhas), leveduras (setas amarelas), assim como também são visualizadas células prolongadas, características de hifas (círculos azuis, Figura 32). Ocorrem também áreas sem colonização microbiana. Não se observa nenhum indicativo de relacionamento entre as espécies microbianas nesta imagem, apesar de as duas espécies poderem ser identificadas e diferenciadas morfolologicamente.

6 DISCUSSÃO

Em uma atualidade onde a Odontologia conta com avançadas técnicas e materiais que podem ser empregados de acordo com as peculiaridades de cada caso clínico visando a reposição da perda do elemento dental, o uso de próteses totais convencionais na reabilitação oral de pacientes totalmente desdentados ainda é uma realidade, seja devido ao baixo custo, limitações sistêmicas ou escolha particular do indivíduo⁴⁵. Nesses casos, muitas vezes como coadjuvante do tratamento com próteses totais convencionais, os adesivos para próteses podem auxiliar no aumento da retenção e consequentemente no desempenho geral das próteses ao atuarem aumentando a viscosidade da saliva presente entre a base protética e mucosa^{22,32,59}.

No presente trabalho, buscou-se explorar o efeito dos adesivos protéticos *Ultra Corega creme* e *Corega Fita adesiva* sobre o crescimento e colonização de duas cepas microbianas (*C. albicans* SC 5314 e *L. casei* ATCC 4646), de maneira isolada e em conjunto. Ainda buscou-se averiguar se as duas espécies estudadas têm efeito antagonista, sinergista ou neutro uma sobre a outra. Em ambos os ensaios, Adesão e formação de Biofilme, observou-se que em quase todas as situações (*Adesivo Creme*, *Adesivo Fita* e *Sem Adesivo*), quando uma mesma espécie foi comparada em sua situação simples e misto, não foi observada diferença estatisticamente significativa, refletindo assim que praticamente nenhuma relação de sinergismo ou antagonismo foi observada entre os dois micro-organismos. A única exceção foi a espécie *L. casei* em seu cultivo de formação de Biofilme e na situação *Sem Adesivo*, onde observou-se maior crescimento em cultivo simples do que em cultivo misto com *C. albicans*.

Durante os testes de Adesão, observou-se que *L. casei*, de maneira geral, não difere sua aderência quando adesivos são utilizados. Em uma única exceção, quando cultivado de maneira mista com *C. albicans*, *L. casei* aderiu mais *Sem Adesivo* do que quando o *Adesivo Creme* foi empregado. Ainda, observou-se que *C. albicans* tanto em simples quanto em misto adere mais quando cultivada em *Adesivo Fita* do que nas outras situações (*Adesivo Creme* e *Sem Adesivo*). Tal achado contrasta com um estudo recente de Rajaram et al.⁶⁶ (2017), que observaram efeito antifúngico de 3 formas físicas de apresentação de adesivos protéticos, havendo

inclusive efeito prolongado no adesivo em forma de fita. No entanto, os adesivos da marca comercial utilizada no referido estudo (*Secure*) apresentam em sua composição agentes antimicrobianos, o que explica a discrepância de resultados. A inclusão de componentes antimicrobianos na composição dos adesivos protéticos é uma recomendação relevante aos fabricantes destes produtos²⁰, e uma sugestão é que a informação sobre a existência de tais componentes seja destacada na embalagem do produto, visto que representa uma estratégia interessante para um maior controle da incidência de estomatite protética nos pacientes que utilizam adesivos protéticos em suas de próteses totais.

Observou-se maior dificuldade da espécie bacteriana formar biofilme em seu cultivo simples nos substratos com adesivos, já em seu cultivo misto não foi observada diferença de desenvolvimento entre as situações *Sem Adesivo* ou com os dois adesivos testados. *C. albicans* (simples e misto) mostrou maior predisposição para formação de biofilme no substrato com *Adesivo Fita*, o que pode ser explicado pela composição deste adesivo, que contém mais componentes bioadesivos em relação ao outro adesivo testado, e ausência de umidificantes como o óleo mineral e a vaselina, componentes estes que estão presentes na formulação do *Adesivo Creme*.

O perfil de colonização, incluindo o padrão de adesão sobre uma superfície ou a morfologia de biofilmes formados em diferentes superfícies, pode ser analisado por microscopia de fluorescência, MEV ou microscopia confocal a laser¹¹. Neste estudo, optou-se por MEV pois o material utilizado na fabricação dos espécimes (resina acrílica) apresenta alto índice de fluorescência e tem como característica a incorporação de fluoróforos (devido à sua porosidade), o que prejudicaria a análise caso outra opção fosse escolhida.

Um dado relevante de nossa avaliação qualitativa foi que, durante a formação de Biofilme e na situação *Sem Adesivo*, tanto *L. casei* simples quanto *C. albicans* simples pareceram ter seu desenvolvimento visualmente mais intenso, o que foi caracterizado pela formação de material polimérico por *L. casei* e formação de hifas por *C. albicans*. A formação de hifas por *C. albicans* é uma característica relacionada à invasão tecidual, o que pode causar maior dano ao hospedeiro, e representa um passo essencial na patogênese da candidíase⁶².

Apesar de vários trabalhos sugerirem que diferentes espécies probióticas de *Lactobacillus* podem atuar direta ou indiretamente no combate às infecções por *Candida*^{10,28,42,43,47,51,68,72,82}, neste estudo não observou-se nenhum resultado sugestivo de inibição da cepa de *Lactobacillus* estudada (*L. casei* ATCC 4646) sobre o crescimento de *C. albicans* (cepa SC 5314), seja no aspecto quantitativo ou por análise em MEV. Tal resultado, apesar de contrastante, pode ser explicado devido ao uso, neste trabalho, de uma cepa bacteriana patogênica específica, sem capacidade probiótica demonstrada até então, apesar de haverem evidências de que *Lactobacillus casei* estão presentes no ambiente oral^{17,40,81}. Ressalta-se no entanto que, como demonstrado anteriormente em amostras clínicas, existe associação entre *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp. no desenvolvimento da estomatite protética⁴⁹. Portanto, a escolha de cepas para estudos in vivo que tenham como objetivo a confirmação de ação probiótica requer a execução exaustiva de estudos in vitro a fim de determinar as melhores cepas com tal potencial, assim como para que tais cepas não promovam a virulência de *Candida* spp. e sim o efeito desejado de diminuir ou inibir a patogenicidade desses fungos.

De um modo geral, observou-se também que o fungo se desenvolveu de maneira quantitativamente superior à espécie bacteriana, confirmando a grande capacidade de adesão e proliferação já conhecida de *C. albicans* em materiais protéticos ou tecidos duros e moles da cavidade oral²¹, assim como a produção de biofilme complexo e heterogêneo^{70,84}.

Alguns dos resultados encontrados nas análises quantitativas desta pesquisa foram reforçados após a caracterização das condições experimentais por imagem, no caso dos ensaios de formação de Biofilmes. Observou-se que *L. casei* simples na condição *Sem Adesivo* teve maior crescimento do que quando os adesivos testados eram utilizados, refletindo assim que os adesivos dificultaram o desenvolvimento da cepa bacteriana quando cultivada de maneira isolada. Além disso, *C. albicans* tanto simples quanto misto se desenvolveu mais no *Adesivo Fita* do que no *Adesivo Creme*, o que sugere que especialmente na forma física de fita a marca comercial do produto considere a incorporação de antimicrobianos em sua composição.

Apesar da existência de uma variedade de estudos atuais na literatura científica que investigam o papel dos adesivos protéticos sobre o desenvolvimento

fúngico, especialmente espécies de *Candida*^{20,29,33,50,66,71}, maiores investigações sobre as inter-relações entre bactérias e fungos são ainda necessárias para uma melhor compreensão acerca das interações microbiológicas na cavidade oral de usuários de próteses totais, especialmente quando fazem o uso de adesivos, assim como também para consolidar as informações encontradas neste trabalho.

7 CONCLUSÕES

Dentro das limitações deste estudo in vitro foi possível concluir que:

1. Não observou-se praticamente nenhuma inter-relação entre os dois micro-organismos estudados;
2. *L. casei*, de maneira geral, não diferiu sua Adesão quando adesivos foram utilizados;
3. *C. albicans* aderiu mais quando cultivada em *Adesivo Fita*;
4. *L. casei* (simples) formou mais Biofilme na situação *Sem Adesivo*;
5. *C. albicans* formou mais Biofilme quando o *Adesivo Fita* foi utilizado do que quando empregou-se *Adesivo Creme*;
6. Os dois micro-organismos, na análise qualitativa e na situação *Sem Adesivo*, deram indício de desenvolvimento mais intenso.

REFERÊNCIAS*

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-32.
2. Adisman K. The use of denture adhesive as an aid to denture treatment. *J Prosthet Dent.* 1989; 62(6): 711–5.
3. Allison DL, Willems HM, Jayatilake JA, Bruno VM, Peters BM, Shirliff ME. Candida-bacteria interactions: their impact on human disease. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0030-2016.
4. Barbenel JC. Physical retention of complete dentures. *J Prosthet Dent.* 1971; 26(6): 592-600.
5. Bates AM, Garaicoa JL, Fischer CL, Brogden KA. Diminished antimicrobial peptide and antifungal antibiotic activities against candida albicans in denture adhesive. *Antibiotics (Basel).* 2017 feb 6; 6(1). [Epub ahead of print].
6. Bilhan H, Sulun T, Erköse G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O et al. The role of Candida albicans hyphae and Lactobacillus in denture-related stomatitis. *Clin Oral Investig.* 2009; 13(4): 363-8.
7. Bogucki ZA, Napadlek P, Dabrowa T. A clinical evaluation denture adhesives used by patients with xerostomia. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94(7): e545.
8. Budtz-Jørgensen E. Ecology of Candida-associated denture stomatitis. *Microb Ecol Health Dis.* 2000; 12: 170-85.
9. Bulgasem BY, Lani MN, Hassan Z, Wan Yusoff WM, Fnaish SG. Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against pathogenic candida species. *Mycobiology.* 2016; 44(4): 302-9.
10. do Carmo MS, Noronha FM, Arruda MO, Costa ÊP, Bomfim MR, Monteiro AS et al. *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 Displays *In vitro* Inhibitory Activities against *Candida* spp. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1722.
11. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of Candida biofilms. *Nat Protoc.* 2008; 3(12): 1909-24.
12. Chew CL. Movement of maxillary complete dentures - a kinesiographic study. *J Dent.* 1983; 11(3): 257-63.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. Chew CL, Boone ME, Swartz ML, Phillips RW. Denture adhesives: their effects on denture retention and stability. *J Dent.* 1985; 13(2): 152-9.
14. Coates AJ. Usage of denture adhesives. *J Dent.* 2000; 28(2): 137-40.
15. Coimbra FC, Salles MM, De Oliveira VC, Macedo AP, Da Silva CH, Pagnano VO et al. Antimicrobial efficacy of complete denture cleansers. *Am J Dent.* 2016; 29(3): 149-53.
16. Compagnoni MA, de Souza RF, Marra J, Pero AC, Barbosa DB. Relationship between *Candida* and the nocturnal denture wear: quantitative study. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(8): 600-5.
17. Emilson CG, Thorselius I. Prevalence of mutans streptococci and lactobacilli in elderly Swedish individuals. *Scand J Dent Res.* 1988; 96(1): 14-21.
18. Fakhri H, Fayaz A, Faramarzi F, Javaheri HH. The knowledge and attitude of general dentists toward denture adhesives in Tehran. *Indian J Dent Res.* 2009; 20(2): 164-8.
19. Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures. A publication of the American College of Prosthodontics. *J Am Dent Assoc.* 2011; 142 Suppl 1: 1S-20S.
20. Garaicoa JL, Fischer CL, Bates AM, Holloway J, Avila-Ortiz G, Guthmiller JM et al. Promise of combining antifungal agents in denture adhesives to fight *Candida* species infections. *J Prosthodont.* 2016 Nov 21. [Epub ahead of print].
21. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.
22. Grasso JE. Denture adhesives: changing attitudes. *J Am Dent Assoc.* 1996; 127(1): 90-6.
23. Grasso JE. Denture adhesives. *Dent Clin North Am.* 2004; 48(3): 721-33.
24. Grasso JE, Rendell J, Gay T. Effect of denture adhesive on the retention and stability of maxillary dentures. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(4): 399-405.
25. Han JM, Hong G, Hayashida K, Maeda T, Murata H, Sasaki K. Influence of composition on the adhesive strength and initial viscosity of denture adhesives. *Dent Mater J.* 2014; 33(1): 98-103.
26. Hasegawa S, Sekita T, Hayakawa I. Effect of denture adhesive on stability of complete dentures and the masticatory function. *J Med Dent Sci.* 2003; 50(4): 239-47.
27. Ishikawa KH, Mayer MP, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG, Paula CR et al. A multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers. *J Prosthodont.* 2015; 24(3): 194-9.

28. Jørgensen MR, Kragelund C, Jensen PØ, Keller MK, Twetman S. Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro. *J Oral Microbiol.* 2017; 9(1): 1274582.
29. Kim E, Driscoll CF, Minah GE. The effect of a denture adhesive on the colonization of *Candida* species in vivo. *J Prosthodont.* 2003; 12(3): 187-91.
30. Köhler GA, Assefa S, Reid G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012; 2012: 636474.
31. Kulak Y, Ozcan M, Arikan A. Subjective assessment by patients of the efficiency of two denture adhesive pastes. *J Prosthodont.* 2005; 14(4): 248-52.
32. Kumar PR, Shajahan PA, Mathew J, Koruthu A, Aravind P, Ahammed MF. Denture adhesives in prosthodontics: an overview. *J Int Oral Health.* 2015; 7(Suppl 1): 93-5.
33. Leite AR, Mendoza-Marin DO, Paleari AG, Rodriguez LS, Roccia AA, Policastro VB et al. Crossover clinical trial of the influence of the use of adhesive on biofilm formation. *J Prosthet Dent.* 2014; 112(2): 349-56.
34. Li D, Li Q, Liu C, Lin M, Li X, Xiao X et al. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of *Candida*-associated stomatitis. *Mycoses.* 2014; 57(3): 141-6.
35. Lindstrom RE, Pawelchak J, Heyd A, Tarbet WJ. Physical-chemical aspects of denture retention and stability: a review of the literature. *J Prosthet Dent.* 1979; 42(4): 371-5.
36. Makihiro S, Nikawa H, Satonobu SV, Jin C, Hamada T. Growth of *Candida* species on commercial denture adhesives in vitro. *Int J Prosthodont.* 2001; 14(1): 48-52.
37. Mañes JF, Selva EJ, De-Barutell A, Bouazza K. Comparison of the retention strengths of three complete denture adhesives: an in vivo study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16(1): e132-6.
38. Manfredi M, Merigo E, Salati A, Conti S, Savi A, Polonelli L et al. In vitro candidacidal activity of a synthetic killer decapeptide (KP) against *Candida albicans* cell adhered to resin acrylic discs. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36: 468-71.
39. Marra J. Atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética combinada a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2011.
40. Marsh PD, Percival RS, Challacombe SJ. The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. *J Dent Res.* 1992; 71(7): 1374-81.

41. Matsubara VH, Wang Y, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100(14): 6415-26.
42. Mezzasalma V, Manfrini E, Ferri E, Boccarusso M, Di Gennaro P, Schiano I et al. Orally administered multispecies probiotic formulations to prevent uro-genital infections: a randomized placebo-controlled pilot study. *Arch Gynecol Obstet*. 2017; 295(1): 163-72.
43. Miyazima TY, Ishikawa KH, Mayer M, Saad S, Nakamae A. Cheese supplemented with probiotics reduced the *Candida* levels in denture wearers-RCT. *Oral Dis*. 2017; 23(7): 919-25.
44. do Nascimento C, Ferreira de Albuquerque Junior R, Issa JP, Ito IY, Lovato da Silva CH, de Freitas Oliveira Paranhos H et al. Use of the DNA Checkerboard hybridization method for detection and quantitation of *Candida* species in oral microbiota. *Can J Microbiol*. 2009; 55(5): 622-6.
45. Nicolas E, Veyrune J, Lassauzay C. A six-month assessment of oral health-related quality of life of complete denture wearers using denture adhesive: a pilot study. *J Prosthodont*. 2010; 19(6): 443-8.
46. Niedermeier WH, Krämer R. Salivary secretion and denture retention. *J Prosthet Dent*. 1992; 67(2): 211-6.
47. Niu XX, Li T, Zhang X, Wang SX, Liu ZH. *Lactobacillus crispatus* modulates vaginal epithelial cell innate response to *Candida albicans*. *Chin Med J (Engl)*. 2017; 130(3): 273-9.
48. Nunes ÉM, Policastro VB, Scavassin PM, Leite AR, Mendoza Marin DO, Giro G et al. Crossover clinical trial of different methods of removing a denture adhesive and the influence on the oral microbiota. *J Prosthet Dent*. 2016; 115(4): 462-8.
49. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS ONE*. 2015; 10(9): e0137717.
50. Oliveira MC, Oliveira VM, Vieira AC, Rambob I. In vivo assessment of the effect of an adhesive for complete dentures on colonisation of *Candida* species. *Gerodontology*. 2010; 27(4): 303-7.
51. Oliveira VM, Santos SS, Silva CR, Jorge AO, Leão MV. *Lactobacillus* is able to alter the virulence and the sensitivity profile of *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*. 2016; 121(6): 1737-44.

52. Oliveira Junior NM, Rodriguez LS, Mendoza Marin DO, Paleari AG, Pero AC, Compagnoni MA. Masticatory performance of complete denture wearers after using two adhesives: A crossover randomized clinical trial. *J Prosthet Dent*. 2014; 112(5): 1182-7.
53. Orsi CF, Sabia C, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia RG, Peppoloni S et al. Inhibitory effects of different lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014; 28(4): 743-52.
54. Ozkan YK, Uçankale M, Ozcan M, Uner N. Effect of denture adhesive on the micro-organisms in vivo. *Gerodontology*. 2012; 29(1): 9-16.
55. Panagiotouni E, Pissiotis A, Kapari D, Kaloyannides A. Retentive ability of various denture adhesive materials: an in vitro study. *J Prosthet Dent*. 1995; 73(6): 578-85.
56. Panariello, BHD. Eficácia da imersão e da escovação mecânica combinada com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução da viabilidade de biofilme multi-espécies [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2013.
57. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effects of short-term immersion and brushing with different denture cleansers on the roughness, hardness, and color of two types of acrylic resin. *Am J Dent*. 2015; 28(3): 150-6.
58. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. *Am J Dent*. 2016; 29(3): 154-60.
59. Papadiochou S, Emmanouil I, Papadiochos I. Denture adhesives: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2015; 113(5): 391-7.
60. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(8): 755-64.
61. Perin Leite AR, de Oliveira Júnior NM, Mendoza Marin DO, Compagnoni MA, Pero AC. Proinflammatory cytokine production from NOK-SI keratinocytes after exposure to denture adhesives. *J Prosthet Dent*. 2017 jul 7. [Epub ahead of print]
62. Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol*. 2015; 91: 139-235.
63. Polyzois GL, de Baat C. Attitudes and usage of denture adhesives by complete denture wearers: a survey in Greece and the Netherlands. *Gerodontology*. 2012; 29(2): e807-14.

64. Polyzois G, Stefaniotis T, Papaparaskevas J, Donta C. Antimicrobial efficacy of denture adhesives on some oral malodor-related microbes. *Odontology*. 2013; 101(1): 103-7.
65. Pradíes G, Sanz I, Evans O, Martínez F, Sanz M. Clinical study comparing the efficacy of two denture adhesives in complete denture patients. *Int J Prosthodont*. 2009; 22(4): 361-7.
66. Rajaram A, Manoj SS. Influence of 3 different forms of a commercially available denture adhesive material on the growth of *Candida* species: an in vitro study. *J Prosthet Dent*. 2017; 118(3): 379-85.
67. Regis RR, Della Vecchia MP, Pizzolitto AC, Compagnoni MA, Souza PP, de Souza RF. Antimicrobial properties and cytotoxicity of an antimicrobial monomer for application in prosthodontics. *J Prosthodont*. 2012; 21(4): 283-90.
68. Rossoni RD, Fuchs BB, de Barros PP, Velloso MD, Jorge AO, Junqueira JC et al. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0173332.
69. Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. *J Prosthodont*. 2008; 17(5): 348-56.
70. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2): e139-43.
71. Sampaio-Maia B, Figueiral MH, Sousa-Rodrigues P, Fernandes MH, Scully C. The effect of denture adhesives on *Candida albicans* growth in vitro. *Gerodontology*. 2012; 29(2): e348-56.
72. Song YG, Lee SH. Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on *Candida* biofilm of denture surface. *Arch Oral Biol*. 2017; 76: 1-6.
73. Stafford GD, Russell C. Efficiency of denture adhesives and their possible influence on oral microorganisms. *J Dent Res*. 1971; 50(4): 832-6.
74. Tarib NA, Bakar MT, Murat MDTA, Ahmad M, Kamarudin KH. Masticatory effect and bite force in complete dentures: a study of denture adhesive. *Hong Kong Dent J*. 2010; 7(2): 67-73.
75. Teles FR, Teles RP, Sachdeo A, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G et al. Comparison of microbial changes in early redeveloping biofilms on natural teeth and dentures. *J Periodontol*. 2012; 83(9): 1139-48.
76. Theilade E, Budtz-Jørgensen E, Theilade J. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with healthy oral mucosa. *Arch Oral Biol*. 1983; 28(8): 675-80.

77. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(8): 672-80.
78. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(12): 1200-8.
79. Toda C. Avaliação da atividade antimicrobiana de um reembasador resiliente combinado a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2013.
80. Ujaoney S, Chandra J, Faddoul F, Chane M, Wang J, Taifour L et al. In vitro effect of over-the-counter probiotics on the ability of *Candida albicans* to form biofilm on denture strips. *J Dent Hyg.* 2014; 88(3): 183-9.
81. Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *J Dent.* 2013; 41(5): 420-7.
82. Wang S, Wang Q, Yang E, Yan L, Li T, Zhuang H. Antimicrobial compounds produced by vaginal *Lactobacillus crispatus* are able to strongly inhibit *Candida albicans* growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions. *Front Microbiol.* 2017; 8: 564.
83. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13(2): 136-40.
84. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2011; 49(2): 208-11.

APÊNDICE

TABELA A1 - Estatística descritiva dos dados da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (média, desvio padrão e coeficiente de variação, em $\log_{10}$) para a situação experimental de Adesão.

Micro-organismo	Adesivo	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)	
<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> simples	Adesivo Creme	4,69	0,24	5,14
		Adesivo Fita	4,68	0,24	5,05
		Sem Adesivo	4,86	0,30	6,26
	<i>L. casei</i> misto	Adesivo Creme	4,30	0,59	13,71
		Adesivo Fita	4,64	0,35	7,55
		Sem Adesivo	4,94	0,14	2,75
<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> simples	Adesivo Creme	5,41	0,31	5,75
		Adesivo Fita	5,97	0,18	3,00
		Sem Adesivo	5,43	0,18	3,33
	<i>C. albicans</i> misto	Adesivo Creme	5,21	0,46	8,84
		Adesivo Fita	5,89	0,23	3,89
		Sem Adesivo	5,48	0,20	3,66

Fonte: Elaboração própria.

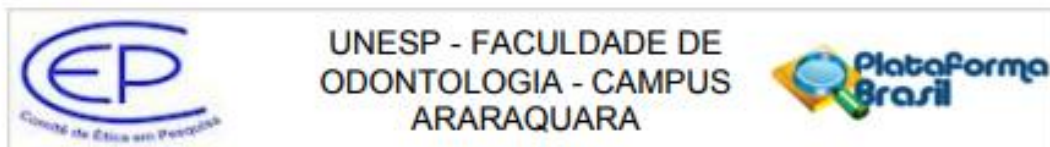
TABELA A2 - Estatística descritiva dos dados da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (média, desvio padrão e coeficiente de variação, em $\log_{10}$) para a situação experimental de Biofilme.

Micro-organismo	Adesivo	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)	
<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> simples	Adesivo Creme	6,77	0,27	4,06
		Adesivo Fita	6,76	0,31	4,59
		Sem Adesivo	7,19	0,13	1,81
	<i>L. casei</i> misto	Adesivo Creme	6,47	0,15	2,28
		Adesivo Fita	6,51	0,16	2,52
		Sem Adesivo	6,34	0,31	4,96
<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> simples	Adesivo Creme	7,48	0,39	5,23
		Adesivo Fita	7,85	0,22	2,86
		Sem Adesivo	7,68	0,47	6,06
	<i>C. albicans</i> misto	Adesivo Creme	7,41	0,23	3,12
		Adesivo Fita	7,77	0,16	2,04
		Sem Adesivo	7,77	0,46	5,95

Fonte: Elaboração própria.

ANEXO

ANEXO A - Certificado de aprovação pelo site da Plataforma Brasil



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE IN VITRO DE ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME ENTRE DUAS ESPÉCIES DE MICRO-ORGANISMOS COM USO DE DOIS ADESIVOS

Pesquisador: Marco Antonio Compagnoni

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 36069714.7.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 17/10/2017

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.385.628

Apresentação da Notificação:

Trata-se da apresentação do relatório final da pesquisa.

Objetivo da Notificação:

- 1 - Verificar se os adesivos Ultra Corega Creme e Corega Fita Adesiva interferem na adesão e formação de biofilme simples e misto.
- 2 - Observar possíveis relações de sinergismo ou antagonismo entre as espécies de *Candida albicans* e *Lactobacillus casei*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve ocorrência de dano decorrente dos riscos previstos.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Conclusões da pesquisa: (1) Não observou-se relações de sinergismo ou antagonismo entre os

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

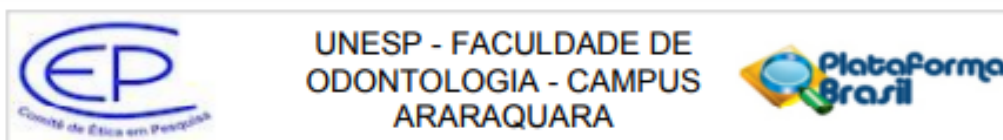
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.385.628

dois micro-organismos estudados; (2) L. casei, de maneira geral, não difere sua adesão quando adesivos são utilizados; (3) C. albicans aderiu mais em Adesivo Fita do que nas outras situações; (4) L. casei (simples) formou mais biofilme na situação Sem Adesivo do que quando adesivos foram utilizados; (5) C. albicans (simples e misto) formou mais biofilme quando o Adesivo Fita foi utilizado do que quando empregou-se Adesivo Creme (6) Na análise qualitativa e na situação Sem Adesivo, os dois micro-organismos apresentaram crescimento mais intenso.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação foram apresentados. Recebeu bolsa de doutorado da Capes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Relatório Final APROVADO em reunião de 17 de Novembro de 2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatorio_Final.doc	17/10/2017 16:37:48	Marco Antonio Compagnoni	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 17 de Novembro de 2017

Assinado por:
Ligia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680
 Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: (16)3301-6459 E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data da
defesa

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 29 de janeiro de 2018

Norberto Martins de Oliveira Junior