

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/04/2020.



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



MARIA ISABEL AMAYA ARBELAEZ

**EFEITO DA IMERSÃO EM SOLUÇÕES DESINFETANTES NA CAPACIDADE
DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *C. ALBICANS* E CARACTERÍSTICAS
TOPOGRÁFICAS DE UMA RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE E
UM REEMBASADOR**

Araraquara

2016



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



MARIA ISABEL AMAYA ARBELAEZ

**EFEITO DA IMERSÃO EM SOLUÇÕES DESINFETANTES NA CAPACIDADE
DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *C. ALBICANS* E CARACTERÍSTICAS
TOPOGRÁFICAS DE UMA RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE E
UM REEMBASADOR**

**Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Reabilitação Oral. Área
de Prótese da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista para título de Mestre em
Reabilitação Oral**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Janaina Habib
Jorge**

Araraquara

2016

MARIA ISABEL AMAYA ARBELAEZ

EFEITO DA IMERSÃO EM SOLUÇÕES DESINFETANTES NA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *C. ALBICANS* E CARACTERÍSTICAS TOPOGRÁFICAS DE UMA RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE E UM REEMBASADOR

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Prof^a Dr^a Janaina Habib Jorge

2^o Examinador: Prof^a Dr^a Nara Hellen Campanha Bombarda

3^o Examinador: Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero Vizoto

Araraquara, 25 de abril de 2016

MARIA ISABEL AMAYA ARBELAEZ

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 12/09/1981- Medellín- Antioquia- Colômbia

Filiação: Rafael Jenaro Amaya Suarez e Luz Amalia Arbeláez Henao

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2001 – 2005: Curso de graduação – Faculdade de Odontologia Universidade CES, Medellín, Antioquia, Colômbia.

2014 – 2016: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Curso de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

AGRADECIMENTO

À minha família, em especial aos meus pais, Rafael e Amália, agradeço pelo apoio e pelo exemplo que me impulsionam a tentar ser uma pessoa melhor, e ao meu irmão Esteban, pelos momentos de descontração.

Ao Juan Pablo pela ajuda constante, por ser o companheiro de todas as horas, obrigada pelo incentivo, pelo apoio e principalmente pela sua infinita paciência.

À minha orientadora, Professora Dr^a. Janaina Habib, pelo bom recebimento na sua linha de pesquisa, por toda a ajuda e orientação durante a realização deste mestrado. E por estar sempre com aquela boa disposição para me ajudar em tudo.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, por ter me aceitado no programa de pós-graduação. A todos os professores do Programa em Reabilitação Oral, agradeço por todo aprendizado recebido durante meu mestrado.

Agradeço à CAPES pela bolsa oferecida durante esses 24 meses.

Aos meus amigos da Faculdade especialmente Manuel e Diego; a todos os meus companheiros obrigada pela companhia, pela amizade, e por todos os ensinamentos valiosos.

A todos os funcionários da biblioteca, em especial à Ines, obrigada pelo auxílio e pela disponibilidade sempre.

A todos, que durante meu mestrado, participaram direta ou indiretamente da minha caminhada e que de alguma forma me ajudaram na concretização deste estudo, meu muitíssimo obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
3 PROPOSIÇÃO	16
4 MATERIAL E MÉTODO	17
4.1 Material	17
4.2 Instrumentos	19
4.3 Aparelhos	19
4.4 Método	21
4.4.1 Confeção dos corpos de prova	21
4.4.2 Grupos experimentais	23
4.4.3 Valores de pH	23
4.4.4 Cultura de micro-organismos	24
4.4.5 Formação de biofilme	25
4.4.6 Método de contagem de colônias (UFC/mL)	26
4.4.7 Ensaio Alamar Blue®	26
4.4.8 Análise das amostras por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	27

4.4.9 Metodologia estatística	27
5 RESULTADO	28
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A	46

Amaya Arbeláez MI. Efeito da imersão em soluções desinfetantes na capacidade de formação de biofilme de *C.albicans* e características topográficas de uma resina acrílica para base de prótese e um reembasador [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme de *Candida albicans* sobre resinas acrílicas para base (Vipi Wave) e reembasamento (Tokuyama Rebase Fast II) de próteses, após imersão diária por períodos de até 6 meses em soluções desinfetantes. Foram confeccionados 360 corpos de prova circulares de cada resina acrílica usando uma matriz metálica (14 x 1,2 mm). As amostras foram imersas overnight durante 0, 1, 3, e 6 meses em 5 soluções desinfetantes: hipoclorito de sódio 0,5%, perborato de sódio 3,8%, digluconato de clorexidina 2%, vinagre de maçã puro (Minhoto®) e água destilada (grupo controle). Após os diferentes períodos de imersão, um biofilme maduro de 48h de *C. albicans* (cepa ATCC 90028) foi formado sobre os corpos de prova. A capacidade de formação deste biofilme foi analisada utilizando o método de contagem de colônias (UFC/mL) e o ensaio de viabilidade celular Alamar Blue®. Para todos os grupos experimentais, imagens foram obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação das características topográficas das resinas após a imersão nos diferentes tempos. Todos os experimentos foram realizados em três ocasiões independentes. Análise de variância de três fatores (ANOVA) foi utilizada para avaliar o metabolismo celular (ensaio Alamar Blue®) e os valores de UFC/mL obtidos a partir da formação do biofilme de *C. albicans*. Foi adotado o nível de significância de 5%. Os resultados de Alamar Blue® mostraram um efeito significativo no tempo de armazenamento ($p < 0,001$). O teste de Tukey identificou que a média inicial (tempo zero) dos valores de fluorescência foi mais elevada do que a média em qualquer tempo de armazenamento, sendo estes equivalentes uns aos outros. Em relação ao UFC/mL, a análise de variância não mostrou diferença significativa entre os grupos. Os resultados mostraram também que as duas resinas acrílicas tiveram o mesmo comportamento em relação à capacidade de formação do biofilme após imersão em diferentes soluções. A partir da análise das imagens do MEV, foi possível observar alteração superficial, de ambas as resinas, de acordo com o tempo, após a imersão em todas as soluções. Pode-se concluir que o tipo de solução desinfetante e a imersão diária (overnight) por período prolongado influenciaram o metabolismo celular do biofilme de *C. albicans*.

Palavras-chave: Biofilmes. Resinas acrílicas. Reembasadores de dentadura. Desinfetantes.

Amaya Arbeláez MI. Effect of immersion in disinfectant solutions in *C.albicans* biofilm formation and topographic characteristics of acrylic denture base resin and one hard reline [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect long-term of daily chemical disinfection on the topographic and *Candida albicans* biofilm formation on denture base and reline acrylic resins. Circular specimens (360 of each resin) were fabricated from denture base (Vipi Wave) and reline (Tokuyama Rebase Fast II) acrylic resins (14 x 1,2 mm) and immersed overnight during 0, 1, 3, and 6 months in 5 different solutions: 0,5% sodium hypochlorite, 3,8% sodium perborate, 2%chlorhexidine gluconate, Minhoto® apple vinegar, containing 4%maleic acid; and distilled water. After immersion, *C. albicans* (ATCC 90028) biofilm (48 hours) was formed on specimens surface. The surface topographic and biofilm formation were evaluated at 0, 1, 3, and 6 months. The biofilm formation of *C. albicans* was evaluated using CFU/mL method and Alamar Blue® assay (cell metabolism) and the surface topographic was evaluated using Scanning Electron Microscope (SEM). All experiments were performed in triplicate on three independent occasions and three-way ANOVA and Tukey test were used to assess the cell metabolism and CFU/mL logarithms obtained from *C. albicans* biofilm formation. A 5% significance level was adopted. The results of cell metabolism (Alamar Blue® assay) showed significant effect of storage time ($p < 0.001$) on fluorescence values. The Tukey test indicated that the initial time (zero time) showed the highest values of fluorescence. Regarding CFU/mL logarithms, analysis of variance does not show significant difference between groups. The results showed also that the two resins acrylic evaluated have similar behavior in respect to biofilm formation after immersion in different solutions. From the SEM image analysis, it was possible to observe surface changes, of both resins, according to immersion time, in all solutions. It can be concluded that the type of disinfectant solution and daily storage (overnight) over prolonged periods of time affect the *C. albicans* cell metabolism of biofilm.

Keywords: Biofilms. Acrylic resins. Relines. Disinfectants.

1 INTRODUÇÃO

As próteses removíveis parciais ou totais são confeccionadas com resinas acrílicas, as quais são compostas pela mistura de um polímero, contendo peróxido de benzoíla e um monômero, geralmente o metacrilato de metila. O peróxido de benzoíla pode ser ativado por substâncias químicas incorporadas ao monômero, pela luz, calor, por meio de micro-ondas, banho de água quente ou calor a seco em estufa. Os reembasadores são resinas especialmente formuladas para o reembasamento direto das próteses. Uma vez que os materiais reembasadores estão em contato direto com a fibromucosa que reveste o rebordo residual, suas propriedades mecânicas, físicas e biológicas devem ser similares às das resinas termopolimerizáveis empregadas na confecção de bases de próteses. Porém, as variações na composição química e na pureza dos sistemas de resinas comerciais, o grau de conversão de seus monômeros e as variáveis de manipulação podem influenciar nas propriedades biológicas e físicas das resinas acrílicas de base ou reembasamento de próteses, podendo aumentar as irregularidades superficiais dos materiais¹⁵. As irregularidades na superfície das próteses atuam como um reservatório de micro-organismos, os quais podem penetrar e sobreviver a uma profundidade que varia de 1,0 a 2,0 μm ¹⁴, favorecendo o desenvolvimento de doenças como a estomatite protética.

A estomatite protética é uma lesão inflamatória eritematosa da mucosa, que ocorre em pacientes usuários de próteses. Apesar da etiologia multifatorial, a contaminação por espécies do tipo *Candida spp.* parece ser o fator primordial para o início e propagação da doença²¹. Esses micro-organismos tem a capacidade de colonizar e se aderir em ambos, tecidos orais e resinas acrílicas, além de ter a habilidade de co-agregar bactérias da cavidade oral, formando uma estrutura complexa, coberta por matriz extracelular, denominadas biofilme^{8, 12}. Os biofilmes são capazes de tolerar elevadas concentrações de drogas antifúngicas e podem apresentar resistência à diversos tipos de medicamentos⁶⁴. Por esse aspecto, o tratamento da estomatite protética tem sido um desafio na prática clínica devido a sua alta prevalência e incidência e ao elevado número de casos clínicos relatados como recorrentes após o tratamento com antifúngicos³³.

Para diminuir a recorrência e prevenir novos casos de estomatite protética, diferentes técnicas de desinfecção das próteses têm sido propostas na literatura. O protocolo de desinfecção que associa a limpeza mecânica (escovação) e a imersão em

soluções desinfetantes (desinfecção química) tem sido indicado, pois diminui a formação de biofilmes microbianos e mantem a integridade das próteses^{58,76}. Neste contexto, as pessoas idosas ou com deficiências motoras, cuja destreza manual pode ser limitada, muitas vezes preferem o uso de soluções desinfetantes para higienizar suas próteses, sendo uma alternativa à escovação mecânica⁶.

Uma variedade de produtos de limpeza e desinfecção de próteses com propriedades antimicrobianas estão disponíveis no mercado. Entre os produtos mais utilizados estão as soluções desinfetantes. O hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina e perborato de sódio foram consideradas soluções efetivas contra colonização de *C. albicans* em tempos de imersão de 10 minutos¹⁰. O vinagre de maçã apresentou atividade fungicida contra espécies de *C. albicans* após 120 minutos de imersão na concentração de 10 mg/mL⁴⁹. Os desinfetantes deveriam ser eficazes contra micro-organismos sem causar efeitos prejudiciais sobre as propriedades físicas e mecânicas dos materiais utilizados para confecção ou reembasamento de próteses. Mota et al.⁴⁹ (2014) observaram que o vinagre de maçã foi capaz de prevenir a adesão desses micro-organismos sobre amostras de resinas acrílicas sem causar alteração de cor e de rugosidade após duas horas de imersão na solução. O hipoclorito possui ação antifúngica contra espécies de *Candida spp* em curtos períodos de imersão^{10, 17, 76}. Porém, em temperaturas mais elevadas, a solução pode causar o clareamento da resina^{19, 44, 65}. Além disso, elevada concentração do hipoclorito de sódio e aumento do tempo de imersão da resina acrílica nesta solução podem diminuir a resistência à flexão do material⁵³. Devido seu poder corrosivo, a superfície da resina acrílica pode apresentar mais porosidade pela imersão em hipoclorito de sódio e a dureza pode ser diminuída⁴⁵. O perborato de sódio apresenta uma função efervescente que promove a remoção mecânica de detritos da prótese através da liberação de oxigênio na reação do perborato ou bicarbonato de sódio com a água. Como desinfetante, foi capaz de reduzir a quantidade de espécies de *C. albicans* após tempos de imersão de 60 minutos. Porém, não foi considerado um antifúngico, uma vez que sua ação é reduzida quando comparado com outras soluções desinfetantes^{15, 29}. Os desinfetantes com base em peróxido de solução fortemente alcalina e com alto nível de oxigenação podem dissolver componentes da matriz ou provocar absorção de água ou saliva²⁷, resultando em aumento da rugosidade superficial e diminuição da dureza^{15, 46}. A clorexidina é atualmente considerada solução desinfetante padrão e é a substância mais extensivamente pesquisada na área odontológica em função das suas propriedades

antimicrobianas^{15, 29}. Porém, os efeitos da imersão sobre as propriedades físicas e mecânicas das resinas acrílicas para bases de próteses são ainda contraditórios. Pinto et al.⁶⁰ (2010) e da Silva et al.¹⁵ (2008) encontraram alterações na rugosidade da superfície de resinas acrílicas para base e reembasamento após períodos de imersão entre 10 e 60 minutos em clorexidina 4%. Por outro lado outros autores como Azevedo et al.¹ (2006) e Machado et al.⁴⁷ (2012) não acharam alterações na rugosidade superficial de resinas acrílicas para base e reembasamento após períodos de até 7 dias de imersão em soluções de clorexidina a 4% e 2%.

Panariello et al.⁵⁵ (2014) e Fernandes et al.²³ (2010) avaliaram as propriedades físicas e mecânicas das resinas acrílicas após imersão em diferentes soluções desinfetantes e observaram eficácia dessas soluções na capacidade de inibir a formação dos biofilmes. Porém, nesses estudos, as propriedades foram avaliadas após curtos períodos de imersão. Somente Izumida et al.³⁰ (2014) avaliaram o efeito de diferentes desinfetantes sobre a rugosidade e capacidade de formação do biofilme de *C. albicans* sobre uma resina acrílica para reembasamento de próteses em diferentes tempos durante um ano. Os resultados mostraram que os valores de rugosidade variaram de 0,31 a 0,69 μm para todos os grupos avaliados e nenhuma diferença foi encontrada em relação à capacidade de formação de biofilme de *C. albicans*. Porém, no estudo acima referido, as amostras ficaram imersas nas soluções desinfetantes durante 190 minutos por dia.

A capacidade de formação de biofilme de *C. albicans* sobre resinas acrílicas após imersão diária (overnight), a longo prazo, em diferentes soluções desinfetantes deveria ser avaliada, uma vez que o efeito cumulativo das soluções pode causar alterações irreversíveis na estrutura do polímero, aumentando a rugosidade do material e favorecendo o acúmulo de micro-organismos. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da desinfecção química diária (overnight), a longo prazo, na formação do biofilme de *C. albicans* e na topografia de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

1. O tipo de solução desinfetante e o armazenamento durante períodos prolongados de tempo não afetaram a capacidade de formação de um biofilme de *C. albicans*;

2. As resinas acrílicas utilizadas tiveram o mesmo comportamento em relação à capacidade de formação de biofilme de *C. albicans* em todos os períodos de armazenamento;

3. A partir da análise das imagens do MEV, foi possível observar alteração superficial, de ambas as resinas, de acordo com o tempo, após a imersão em todas as soluções.

REFERÊNCIAS

1. Azevedo A, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Magnani R. Effect of disinfectants on the hardness and roughness of reline acrylic resins. *J Prosthodont*. 2006; 15(4): 235–42.
2. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987; 14(3): 217-27.
3. Barnabé W, de Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*. 2004; 31(5): 453-9.
4. Barsby MJ. A denture base resin with low water absorption. *J Dent*. 1992; 20(4): 240-4.
5. Basson NJ, Quick AN, Thomas CJ. Household products as sanitising agents in denture cleansing. *J Dent Assoc S Afr*. 1992; 47(10): 437-9.
6. Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *J Prosthet Dent*. 1998; 79(4): 454-8.
7. Bessems E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *Int Biodet Biodegr*. 1998; 41(2): 177-83.
8. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9(6): 588-94.
9. Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. 1997; 13(4): 258-69.
10. Buegers R, Rosentritt M, Schneider-Brachert W, Behr M, Handel G, Hahnel S. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2008; 66(3): 174-80.
11. Cakan U, Kara O, Kara HB. Effects of various denture cleansers on surface roughness of hard permanent reline resins. *Dent Mater J*. 2015; 34(2): 246-51.
12. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(3): 359-83.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normizacao-junho-2015.pdf>

13. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc.* 2008; 3(12): 1909-24.
14. Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J.* 1972; 133(3): 101-5.
15. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008; 17(8): 627-33.
16. de Souza RF, de Freitas Oliveira Paranhos H, Lovato da Silva CH, Abu-Naba'a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 7(4): CD007395.
17. de Sousa Porta SR, Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Del Bel Cury AA. Evaluation of sodium hypochlorite as a denture cleanser: a clinical study. *Gerodontology.* 2015; 32(4): 260-6.
18. del Bel Cury AA, Rached RN, Ganzarolli SM. Microwave-cured acrylic resins and silicone gypsum molding technique. *J Oral Rehabil.* 2001; 28(5): 433-8.
19. Devlin H, Kaushik P. The effect of water absorption on acrylic surface properties. *J Prosthodont.* 2005; 14(4): 233-8.
20. Dixon DL, Breeding LC, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. *J Prosthet Dent.* 1999; 81(2): 207-14.
21. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; 11(1): 30-6.
22. 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. *J Prosthodont.* 2011; 20(2): 1-12.
23. Fernandes FH, Orsi IA, Villabona CA. Effects of the peracetic acid and sodium hypochlorite on the colour stability and surface roughness of the denture base acrylic resins polymerised by microwave and water bath methods. *Gerodontology.* 2013; 30(1): 18-25.
24. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effect in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006; 22(3): 211-22.
25. Freitas-Fernandes FS, Cavalcanti YW, Ricomini AP, Silva WJ, Del Bel Cury AA, Bertolini MM. Effect of daily use of an enzymatic denture cleanser on *Candida albicans* biofilms formed on polyamide and poly (methyl methacrylate) resins: an in vitro study. *J Prosthet Dent.* 2014; 112(6): 1349-55.
26. Hamouda IM, Ahmed S a. Effect of microwave disinfection on mechanical properties of denture base acrylic resin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2010; 3(7): 480-7.

27. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent.* 2009; 101(3): 205–13.
28. Huh JB, Lim Y, Youn HI, Chang BM, Lee JY, Shin SW. Effect of denture cleansers on *Candida albicans* biofilm formation over resilient liners. *J Adv Prosthodont.* 2014; 6(2): 109-14.
29. Iseri U, Uludamar A, Kulak Ozkan Y. Effectiveness of different cleaning agents on the adherence of *Candida albicans* to acrylic denture base resin. *Gerodontology.* 2011; 28(4): 271-6.
30. Izumida FE, Jorge JH, Ribeiro RC, Pavarina AC, Moffa EB, Giampaolo ET. Surface roughness and *Candida albicans* biofilm formation on a reline resin after long-term chemical disinfection and toothbrushing. *J Prosthet Dent.* 2014; 112(6): 1523-9.
31. Jackson S, Coulthwaite L, Loewy Z, Scallan A, Verran J. Biofilm development of blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J Prosthet Dent.* 2014; 112(4): 988-93.
32. Jafari AA, Falah-Tafti A, Lotfi-Kamran MH, Zahraei A, Kazemi A. Vinegar as a removing agent of *Candida albicans* from acrylic resin plates. *Jundishapur J Microbiol.* 2012; 5(2): 388-92.
33. Jeganathan S and Lin CC. Denture stomatitis-a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J.* 1992; 37(2): 107-14.
34. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007; 24(1): 52-7.
35. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(3): 340-4.
36. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(3): 203-7.
37. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of time of storage in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int.* 2009; 40(10): 93-100.
38. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun.* 1985; 50(1): 97–101.
39. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005; 20(6): 349-53.

40. Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DM, Vergani CE. Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(1): 1–9.
41. Lygre H, Klepp KN, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching of additives and degradation products from cold-cured orthodontic resins. *Acta Odontol Scand.* 1994; 52(3): 150-6.
42. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching from denture base materials in vitro. *Acta Odontol Scand.* 1995; 53(2): 75-80.
43. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR, Berg E. Leaching of organic additives from dentures in vivo. *Acta Odontol Scand.* 1993; 51(1): 45-51.
44. Lima EMCX, Moura JS, Del Bel Cury AA, García RCMR, Cury JA. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. *J. Oral Rehabil.* 2006; 33(5): 356–62.
45. MacCallum M, Stafford GD, MacCulloch WT, Combe EC. Which cleanser? A report on a survey of denture cleansing routine and the development of a new denture cleanser. *Dent Pract Dent Rec.* 1968; 19(3): 83–9.
46. Machado AL, Breeding LC, Vergani CE, da Cruz Pérez LE. Hardness and surface roughness of reline and denture base acrylic resins after repeated disinfection procedures. *J Prosthet Dent.* 2009; 102(2): 115–22.
47. Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE. Surface roughness of denture base and reline materials after disinfection by immersion in chlorhexidine or microwave irradiation. *Gerodontology.* 2012; 29(2): 375–82.
48. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun.* 1985; 47(1): 11–4.
49. Mota Loureiro AC, Dias de Castro R, de Araújo J y Oliveira E. Antifungal activity of Apple cider vinegar on *Candida species* involved in denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2015; 24(4): 296-302.
50. Nikawa, H., Hamada, T., Yamamoto, T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent.* 1998; 26(4): 299-304.
51. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. *J Prosthet Dent.* 2005; 93(2): 171-6.
52. Nakamoto K, Tamamoto M, Hamada T. Evaluation of denture cleansers with and without enzymes against *Candida albicans*. *J Prosthet Dent.* 1991; 66(6): 792–5.
53. Odagiri K, Sawada T, Hori N, Seimilla K, Otsuji T, Hamada N, Kimoto K. Evaluation of denture base resin after disinfection method using reactive oxygen species (ROS). *Dent Mater J.* 2012; 31(3): 443-8.

54. Orsi IA, Andrade VG. Effect of chemical disinfectants on the transverse strength of heat-polymerized acrylic resins submitted to mechanical and chemical polishing. *J. Prosthet Dent.* 2004; 92(4): 382–8.
55. Panariello B, Izumida F, Moffa E et al. 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
56. Paniarello B, Alves F, Carmello JC. Padronização de curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 90028. In: Paniarello B, Alves F, Carmello JC. Manual de protocolos do laboratorio de microbiología aplicada. Araraquara: Laboratorio de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontología da UNESP; 2014. p.19-20.
57. Paranhos H de F, Peracini A, Pisani MX, Oliveira Vde C, de Souza RF, Silva-Lovato CH. Color stability, surface roughness and flexural strength of an acrylic resin submitted to simulated overnight immersion in denture cleansers. *Braz Dent J.* 2013; 24(2): 152-6.
58. Peracini A, Davi LR, de Queiroz Ribeiro N, De Sousa RF, Lovato da Silva CH, Paranhos H. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. *J Prosthodont Res.* 2010; 54(2): 78-83.
59. Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59(3): 493–503.
60. Pinto L de R, Acosta EJ, Tavora FF, da Silva PM, Porto VC. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard relined acrylic resins. *Gerodontology.* 2010; 27(2): 147–53.
61. Polyzois GL, Zissis AJ, Yannikakis SA. The effect of glutaraldehyde and microwave disinfection on some properties of acrylic denture resin. *Int J Prosthodont.* 1995; 8(2): 150-4.
62. Puri G, Berzins DW, Dhuru VB et al. Effect of phosphate group addition on the properties of denture base resins. *J Prosthet Dent.* 2008; 100(4): 302–8.
63. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent.* 1998; 26(7): 577-83.
64. Ramage G, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab.* 2001; 20(7): 42-4.
65. Robinson JG, McCabe JF, Storer R. Denture bases: the effects of various treatments on clarity, strength and structure. *J Dent.* 1987; 15(4): 159–65.
66. Romo E, Moreno V, et al. Análisis microscópico de la adherencia de *Candida albicans* in vitro sobre resina acrílica utilizada para bases de dentaduras procesada con tres diferentes técnicas. *Rev Odont Mex.* 2006; 10(4): 167-72.

67. Senna PM, Da Silva WJ, Faot F, Del Bel Cury AA. Microwave disinfection: cumulative effect of different power levels on physical properties of denture base resins. *J Prosthodont*. 2011; 20(2): 606–12.
68. Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract*. 2000; 1(2): 28–41.
69. Schwindling FS, Rammelsberg D, Stuber T. Effect of chemical disinfection on the surface roughness of hard denture base materials: a systematic literature review. *Int J Prosthodont*. 2014; 27(3): 215–25.
70. Tuna SH, Keyf F, Gumus HO, Uzun C. The evaluation of water sorption/solubility on various acrylic resins. *Eur J Dent*. 2008; 2(3): 191–7
71. Vallittu PK, Miettinen V, Alakuijala P. Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dent Mater*. 1995; 11(6): 338–42.
72. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent*. 1997; 77(5): 535–9.
73. Viljanen EK, Langer S, Skrifvars M, Vallittu PK. Analysis of residual monomers in dendritic methacrylate copolymers and composites by HPLC and headspace-GC/MS. *Dent Mater*. 2006; 22(9): 845–51.
74. Wong DM, Cheng LY, Chow TW, Clark RK. Effect of processing method on the dimensional accuracy and water sorption of acrylic resin dentures. *J Prosthet Dent*. 1999; 81(3): 300–4.
75. Wu T, Hu W, Guo L, Finnegan M. Development of a new model system to study microbial colonization on dentures. *J Prosthodont*. 2013; 22(5): 344–50.
76. Yilmaz H, Aydin C, Bal BT, Ozcelik B. Effects of disinfectants on resilient denture-lining materials contaminated with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, and *Candida albicans*. *Quintessence Int*. 2005; 36(4): 373–81.
77. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol*. 2010; 55(10): 763–70.
78. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. *Mycoses*. 2011; 54(5): 344–51.