UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

NARA LIGIA MARTINS ALMEIDA

***Equisetum giganteum* e *Punica granatum* Linné associados a
adesivo protético: atividade antimicrobiana contra biofilmes de
*Candida albicans***

BAURU
2016

NARA LIGIA MARTINS ALMEIDA

Equisetum giganteum* e *Punica granatum* Linné associados a adesivo protético: atividade antimicrobiana contra biofilmes de *Candida albicans

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Versão corrigida

BAURU
2016

AL64e Almeida, Nara Ligia Martins
Equisetum giganteum e *Punica granatum* Linné
associados a adesivo protético: atividade
antimicrobiana contra biofilmes de *Candida albicans*
/ Nara Ligia Martins Almeida. – Bauru, 2016.
163p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todas aquelas pessoas que, por algum motivo, desacreditam na capacidade de realizarem seus sonhos. Quem acredita sempre alcança.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto**, por me presentear com a ideia deste trabalho em sua vigência na coordenação do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), por confiar na minha capacidade de execução, por vibrar junto a mim a aprovação da bolsa FAPESP, por me inserir no mundo das Próteses, por estar sempre disposto a me ajudar e a tirar minhas dúvidas sobre a clínica com seus preciosos ensinamentos, pelo suporte da literatura sobre os adesivos, pelos momentos de descontração e por toda a sua contribuição e colaboração. O senhor foi a farinha e a cereja desse bolo!

À **Profª. Drª. Anne Lígia Dokkedal** que, sem sombra de dúvidas, foi peça fundamental para este trabalho sair do papel e seguir adiante. Obrigada por abrir as portas do seu Laboratório para nós e pela parceria durante esses anos. Agradeço de coração por toda a ajuda na realização da análise fitoquímica; sem o apoio, a confiança e a disponibilidade da senhora seria impossível concluir este trabalho!

Ao **Ms. Luiz Leonardo Saldanha**, por me ensinar e me ajudar em todos os protocolos relacionados às plantas, desde a extração até a identificação e pela sua paciência e disposição em tirar todas minhas dúvidas que, diga-se de passagem, eram muitas. Seu apoio e seu domínio sobre a área foram indispensáveis e essenciais. Você é excelente no que faz, muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes**, por disponibilizar o uso do HPLC-PAD em seu laboratório de Eletro Analítica para as análises cromatográficas das matrizes vegetais, muito obrigada professor.

Ao meu querido amigo de graduação **André Luiz Giles de Oliveira**, que me auxiliou na coleta do material vegetal. Sem você, com certeza ainda estaria perdida no meio do matagal. Muito obrigada mesmo!

À minha querida companheira de mestrado **Eliane Ferraz da Costa** (Migs). Você é uma mulher, profissional, mãe, pessoa, amiga incrível. Eu tive muita sorte em poder seguir ao seu lado! Quero te agradecer por tudo que passamos juntas, todas as dúvidas, os perrengues, as inseguranças, os medos, os domingos sem fim, as lâminas indecifráveis, as conversas, o apoio inquestionável e a parceria sincera e verdadeira. Por mais difícil que fosse a caminhada, ao seu lado tudo ficava mais fácil, gostoso e divertido, obrigada por sempre confiar em mim e me colocar pra cima nos meus momentos de encanação, tristeza e cansaço. Ao longo desses anos, minha admiração por você só cresceu. Gostaria de agradecer imensamente por todo o carinho, apoio, ajuda, confiança, parceria, amizade e consideração. Pode contar sempre comigo!

Aos professores do Departamento de Patologia, **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, **Profª. Drª. Denise Tostes Oliveira** e **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, pelo excelente profissionalismo, pelas orientações, pela paciência em me ensinar sobre esse incrível mundo da Odontologia, em particular, das doenças de boca, pela didática fantástica na qual tive a honra em presenciar, por todos os ensinamentos no Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE), que foram, sem dúvida, cruciais para o meu desenvolvimento acadêmico/didático que levarei para a vida toda, e pelo carinho e respeito dos senhores com os alunos; tenho muito orgulho em fazer parte da Patologia!

Às queridas Funcionárias do Departamento de Patologia, **Fátima Aparecida Silveira** (Fatiminha), **Maria Cristina Carrara Fillipe** (Cris) e **Marina Dos Santos Corrêa** (Má) e **Viviane Aparecida Parise Santos**, pessoas incríveis de um coração que não cabe nelas. Obrigada meus amores, por todo auxílio na organização da minha documentação desde a iniciação científica, por aguentarem meus berros e gargalhadas nos corredores do departamento, por todo carinho e por cada abraço apertado seguido de um café quentinho. Vocês são lindas e eficientes!

Aos meus queridos colegas da Patologia, **Agnes Assao, José Burgos** (Pepe), **Karen Pinke** e **Heliton Lima**. Pela companhia nos almoços, pela paciência e disponibilidade em me ensinarem sobre as lâminas da disciplina, que muitas vezes me pareciam todas iguais, pelas discussões científicas que tivemos ao longo destes anos, pelo auxílio na construção dos gráficos deste trabalho e por me ajudarem no que era preciso. Muito obrigada por todo carinho, consideração e apoio que demonstraram ter por mim ao longo dos anos. As coisas foram difíceis a princípio, mas no fim tudo se ajeita.

À **Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek**, por todas as considerações e questionamentos realizados na minha qualificação, que foram cruciais para a elaboração da dissertação e por disponibilizar o uso do Laboratório de Prótese para a análise da rugosidade dos corpos de prova, confiando na minha capacidade e responsabilidade. Muito obrigada professora!

Às meninas da Bioquímica, **Adriana Arruda, Cintia Tokuhara, Flávia Amadeu, Mariana Santesso, Priscila Salomão e Talita Ventura**, que me acompanharam durante os anos do mestrado, participando de algumas disciplinas junto a mim e me auxiliando na confecção de alguns reagentes e no uso do pHmetro. O carinho e a companhia de vocês foram essenciais para tornarem as coisas mais fáceis, prazerosas e divertidas. Em especial, gostaria de agradecer a minha fiel companheira e amiga de longa data **Gabriela Silva Neubern de Oliveira** (Besta), que segue ao meu lado desde a época da graduação, compartilhando os mesmos anseios, trabalhos, dúvidas, alegrias e tristezas, sempre presente vibrando e torcendo por mim a cada meta concluída. Saiba que, independentemente de que o futuro possa nos reservar, você vai junto, sempre aqui no meu coração. Pode contar sempre comigo “bestânia”, a amizade aqui é forte, e a recíproca é verdadeira!

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris**, pela valiosa ajuda e paciência sobre a interpretação das análises estatísticas deste trabalho, sempre me ajudando com muito profissionalismo, carinho e rapidez, na qual ficava impressionada. Um profissional completo!

Ao Centro Integrado de Pesquisa (CIP), na pessoa do **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, lugar que possui um imenso carinho e gratidão, onde passei a maioria dos meus dias de mestranda. Obrigada professor por todo apoio acadêmico e técnico para a elaboração deste trabalho, pelo auxílio em alguns dos meus questionamentos sobre a Odontologia, pela sua santa paciência e educação comigo, e também por ter participado da banca examinadora da minha qualificação, com considerações de extrema importância para a finalização deste trabalho. Muito obrigada, Professor!

Aos funcionários do CIP, **Neusa Caetano Barbosa** (*in memorian*), **Márcia Sirlene Zardin Graeff**, **Marcelo Milanda Ribeiro Lopes** e **Renato Pereira Murback**, obrigada por todo o carinho, consideração, apoio e amizade desde o início da minha chegada na FOB/USP, pelo auxílio na minha iniciação científica, com o uso do Confocal, pelos ensinamentos básicos, porém essenciais, sobre autoclavação, por me apresentarem os famosos “índios” que habitam o CIP-I de madrugada para que, de alguma forma, eu não me sentisse sozinha, por sempre darem um jeitinho nos aparelhos quando quebravam aliviando meus momentos de desespero e por cansarem de escutar minhas histórias e gargalhadas. Em especial, gostaria de agradecer a **Rafaela Alves da Silva Alavarce** por todo auxílio, paciência e colaboração na padronização, elaboração e execução dos protocolos desta dissertação, e desde a minha iniciação científica, por me apresentar o estudo do fitoterápico *Equisetum giganteum*, e por ser essa profissional tão determinada e dedicada, muito obrigada.

Ao Laboratório de Imunopatologia Experimental da UNESP (LIPE/UNESP), na pessoa do **Prof. Dr. Olavo Speranza de Arruda**, **Dr. James Venturini** e da **Profª. Drª. Maria Sueli Parreira de Arruda**, pessoas nas quais fizeram parte integral e fundamental na minha iniciação científica, que "lapidaram" meus conhecimentos na área acadêmica, que me mostraram a importância da força de vontade, disciplina e dedicação quando o assunto é alcançar metas. Lugar onde adquiri o "amor" pelo estudo de *Candida albicans*. Tenho muita gratidão e carinho pelos senhores e por não se esquecerem de mim. Durante os anos no LIPE, aprendi o verdadeiro significado de "a união faz a força".

Às minhas queridas "Lipianas" da velha guarda, **Amanda Ribeiro**, **Angela Finato**, **Débora Almeida**, **Luiza Mimura** e **Bárbara Amorim** e todas as pessoas que passaram por lá, que sempre me apoiaram e torceram por mim durante esta trajetória, e pelos "*helps*" com as trocas de matérias e alguns protocolos. Obrigada pelo carinho, apoio e amizade e por dividirem comigo momentos inesquecíveis, vocês são demais!

Às minhas queridas amigas-irmãs, **Thais Fraga** e **Camila Marchetti**, pessoas que foram essenciais na minha adaptação desde que cheguei a Bauru, que não medem esforços para me ajudar e que estão completamente envolvidas na minha trajetória acadêmica e pessoal. Obrigada **Tha**, por toda consideração, apoio, torcida, amizade e ensinamentos, sejam acadêmicos ou sobre a vida. Sua confiança e amizade foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui, muito obrigada "pardalzinha", com certeza você é exemplo para muitas pessoas. Obrigada **Cá**, por ser essa "mãezona", seu amor com os animais e com a fotografia é inspirador, puro e verdadeiro. Obrigada por estar sempre ao meu lado ou na minha frente, atrás da câmera. Você é linda por dentro e por fora e sinto muito a sua falta. Por fim, vocês são os presentes que Bauru me proporcionou e que vou levar para minha vida toda, sem sombra de dúvida!

Aos queridos colegas do Departamento de Prótese, **Andréa Procópio**, **Denise Gusmão** e **Oscar Marcillo**, que sempre estiveram dispostos a me ajudar em relação a confecção dos corpos de prova, a algumas dúvidas em relação as próteses totais e por todo carinho e apoio neste caminho entre resinas e madrugadas, muito obrigada!

Aos queridos colegas do Departamento de Prótese (Disciplina de Periodontia), **Luísa Valle**, **Gustavo Manfredi** e **Vitor Stuani**, que seguem comigo desde o meu ingresso no Mestrado, compartilhando algumas aulas da Pós-graduação. Obrigada pelo carinho e consideração.

E a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse possível ser realizado, e que seguiram ao meu lado no decorrer no curso de Mestrado, tornando esta trajetória mais leve e prazerosa. **OBRIGADA!**

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), por conceder inicialmente a bolsa de Mestrado, auxiliando no desenvolvimento deste trabalho.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pela confiança em minha capacidade de execução do projeto e em nossa equipe demonstrada através da concessão da bolsa de Mestrado (#2014-07012-7), viabilizando a execução deste trabalho e meu sonho em conhecer a Austrália, muito obrigada!

Ao Jardim Botânico de Bauru, na pessoa do diretor **Luís Carlos Almeida Neto** que viabilizou a elaboração deste projeto por meio da coleta do material vegetal.

À Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP) na pessoa da excelentíssima Diretora **Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, por abrir as portas para poder realizar o curso de Mestrado em uma das melhores Universidades do Brasil, que visa excelência no ensino, proporcionando minha aproximação com a Odontologia.

À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do atual Presidente, **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa da **Prof^a. Dr^a Denise Tostes Oliveira**, responsável por esta área.

À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"** (UNESP/Bauru) que foi o divisor de águas da minha vida, responsável pela minha maturidade, pela minha paixão na área da saúde e pela minha graduação em Ciências Biológicas. Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha formação/transformação me motivando a buscar conhecimento.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação "Prof. Dr. Antônio Gabriel Atta" FOB/USP, na pessoa da chefe técnica **Cybelle de Assumpção Fontes**, pela ajuda na elaboração da ficha técnica deste trabalho e sobre algumas dúvidas na formatação; obrigada pela paciência e colaboração!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Maria Piedade Martins Almeida e Manoel Benedito de Almeida

Mãe, toda vez que menciono esta palavra, meus olhos se enchem de lágrimas, lágrimas de orgulho, saudade, força e amor. Você nos educou em uma perspectiva de amor diferente, amor que liberta, que disciplina, que sempre almeja algo. A senhora sempre foi um exemplo para nós, sinônimo de determinação e de luta diária. Foi muito difícil, mãe, sair da zona de conforto, da cidade natal, do seu lado, mas hoje vejo o quão importante foi tudo isso, hoje olho para trás e vejo uma menina te dando tchau do vidro de um ônibus vindo para Bauru, sem saber como seriam os próximos dias daquele momento em diante. Neste instante, uma lágrima percorria seu rosto, com o mesmo sentimento que hoje me percorre toda vez que me despeço da senhora. Obrigada Mãe, por me criar exatamente assim, para o mundo, hoje dou valor para as pequenas coisas. Hoje eu sei a importância que estas lágrimas tiveram sobre a minha formação. Obrigada por confiar em mim, e me deixar ir, mesmo que sua vontade não fosse essa. Obrigada por não ter passado a mão na minha cabeça, obrigada por vibrar comigo a cada vitória alcançada e obrigada, principalmente, por sempre acreditar no meu potencial, quando nem mesmo eu acreditava. Se eu consegui chegar até aqui, foi porque sempre tive a senhora ao meu lado, mesmo estando a quilômetros de distância. **Pai**, sinônimo de proteção, alegria, cuidados, carinho e heroísmo. Não deve ter sido fácil para o senhor ser pai de três meninas, a atenção e os ciúmes triplicaram. Herdei muito mais do que a sua risada larga, sua garra e força foi distribuída para cada uma de nós. Obrigada por estar sempre disposto a nos ajudar, mesmo sem entender muito bem o que estava acontecendo. Orgulho-me em ter tido uma infância repleta de carinho, cuidados e ensinamentos valiosos, que hoje fazem parte integral do que me transformei. Obrigada por sempre me estender a mão, por repetir mil vezes a mesma coisa, por participar das gincanas na escolinha, por se fazer de “Papai Noel” durante tantos anos somente pelo fato de observar o sorriso em nosso rosto e o brilho em nosso olhar, por cantarolar para dormir e, principalmente,

por me ensinar a sorrir mesmo quando a vontade não é essa. Obrigada pelo abraço apertado em cada despedida, e, principalmente, por aquele abraço no embarque do ônibus da "Nara" de sete anos atrás. **Pai e mãe:** Vocês foram fundamentais para que pudesse concluir cada etapa da minha vida. Eu amo muito vocês.

**Às minhas queridas irmãs, Dayanne Martins Almeida e Rayssa
Nayara Martins de Almeida**

Reps, me enche de orgulho ser sua irmã. Cada vez que me refiro a você, três palavras vêm em minha cabeça: garra, determinação e amor pela profissão. Em uma de nossas conversas no seu quarto há alguns anos atrás, você disse para mim sobre minhas dúvidas em relação ao que queria ser quando crescer: "Independentemente do que escolher, e do que a vida te preparar, faça valer a pena Popes, sempre busque ser o melhor naquilo que faz, as recompensas vêm com o tempo". Hoje, mais do que nunca, vejo quanto você cresceu, o quanto batalhou para chegar onde está, e isto me serve, todos os dias, como espelho. Pudera eu ter metade da sua força. Por que fazer o que você fez/faz não é para qualquer pessoa. Eu te admiro demais minha "irmã", que me criou quando nossa mãe estava lutando diariamente pelo nosso futuro, me ensinou a ler, a escrever e, principalmente, a batalhar pelo nosso sonho. Você é, sem sombra de dúvidas, minha inspiração diária!

Chouris, tenho muita saudade daqueles tempos em que a nossa maior preocupação era a hora de voltar para a casa. Quando vivíamos ali, uma do lado da outra. Hoje, há algumas milhas de distância percebo o quanto sua presença foi importante para mim. Sua trajetória de vida é linda, assim como a Daya, sua força é inquestionável. Existe muito de você em mim e vice-versa, mas o que mais admiro é sua capacidade de transformar uma situação de risco em lições para a vida toda. Essa sua habilidade com as palavras e sua resiliência foram essenciais para chegar onde está. Tenho muito orgulho e muita saudade de você, mas tenho a certeza que um dia vamos rir de tudo isso. Por fim, saiba que pode contar comigo para o que for,

pois, mesmo distante, este vazio é preenchido pelo amor que sempre nos uniu.

À minha irmã do coração Débora Aparecida de Medeiros

Deby, você é a filha que toda mãe gostaria de ter. Muito obrigada por estar do lado dos meus pais quando não era possível estar. Você cuidou deles como seus pais e cuida de nós como suas irmãs. Temos muita sorte em poder tê-la por perto. Com certeza, seu futuro está repleto de realizações. Pode contar sempre comigo quando precisar, e novamente muito obrigada minha irmã do coração, pela disponibilidade, consideração e carinho durante todos esses anos de convivência.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Vanessa Soares Lara

Professora, as palavras me faltam quando o assunto é agradecer à senhora. Lembro-me como se fosse ontem que, mesmo sem nunca ter me visto, a senhora abriu as portas para mim, me acolheu, acreditou e confiou cegamente em meu potencial e me incluiu em sua equipe. Naquele momento difícil da minha vida, finalizou nossa reunião com "Eu quero que você seja feliz aqui, Nara!", saí da sala aos prantos sem que percebesse, pensando "que sorte a minha" e desde então foi a melhor coisa que poderia ter me acontecido. A senhora foi quem me estendeu a mão no momento em que mais precisei e acreditou em mim e em minha capacidade quando eu já não acreditava mais, me mostrou os caminhos que deveria seguir estando sempre disposta a me ouvir. Eu tenho que te agradecer, não só por toda a orientação acadêmica fantástica que me proporcionou durante estes anos de convivência, mas sim na pessoa em que me transformou. Para mim, a senhora sempre foi um exemplo a se seguir, de mãe, mulher, pessoa, esposa, amiga e profissional, sempre me inspirando a ser alguém melhor. Sempre muito justa, compreensível, amável, humilde, correta, carinhosa, serena, elegante, responsável, disponível e humana, acima de tudo. A nossa convivência me fez perceber o quão é importante acreditarmos em nós mesmos. Cada palavra, cada conselho, cada gesto de carinho, ficarão para sempre guardados em meu coração. Tudo que tenho e que alcancei eu devo ao "sim" que a senhora me disse três anos atrás, aprendi ao seu lado que, acima de qualquer coisa, precisamos respeitar nossos limites e que quando gostamos e estamos dispostos a fazer, as coisas caminham naturalmente. Muito obrigada professora, por me ajudar a trabalhar minha inteligência emocional, por ter sido chão quando só enxergava buracos. Eu sou e serei eternamente grata pela oportunidade que me proporcionou, pela confiança que depositou em mim, pelas suas noites mal dormidas corrigindo a dissertação, por me acolher em sua casa em reuniões inacabáveis e principalmente pela amizade e pelo carinho. Se um dia conseguir ser um terço da pessoa/profissional que a senhora é, já me sentirei realizada! Que sorte a minha ter batido em sua porta. Obrigada por tudo professora!

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito, acredite em você.”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Adesivos protéticos inibem a inflamação da mucosa subjacente e podem receber, em sua composição, componentes antimicrobianos, reduzindo o risco do desenvolvimento da estomatite protética (EP), doença relacionada principalmente à colonização das próteses pelo fungo *Candida albicans*. Tem sido relatada a atividade antifúngica de fitoterápicos, podendo auxiliar no tratamento da EP.

Objetivo: Realizar o estudo fitoquímico de substâncias potencialmente ativas de *Equisetum giganteum* (Eg) (“Cavalinha”) e de *Punica granatum* (Pg) (Romã) e avaliar in vitro se a incorporação de extratos hidroalcóolicos de Eg e de Pg a um adesivo protético (COREGA®) influencia no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* (SC5314) sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável (Lucitone 550).

Material e Métodos: Após identificação dos compostos dos fitoterápicos por HPLC-PAD, foi selecionada a fração e a concentração de interesse por meio da concentração inibitória mínima (CIM). Os biofilmes foram induzidos durante 3, 6 ou 12 horas sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica, previamente submetidos ao tratamento com o adesivo associado aos fitoterápicos (**AD/Eg ou AD/Pg**). Como controles, corpos de prova foram tratados apenas com adesivo (**AD**), com a associação adesivo/nistatina (**AD/Nt**) ou não recebiam tratamento (**PBS**). A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da quantificação do biofilme pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e pelo percentual de redução da atividade metabólica das células fúngicas pelo ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT (2,3 Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenil) – 5 - [(Phenyl-Amino) Carbonyl] – 2H - Tetrazolium Hidroxide). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para UFC/mL e Mann-Whitney ou análise de variância ANOVA-2 fatores seguido do teste *post-hoc* de Tukey HSD e teste de Dunnett para XTT. As médias dos valores obtidos pelas duas metodologias (UFC/mL e XTT) foram submetidas ao teste de correlação de Spearman ($\alpha = 0,05$).

Resultados: Foi possível identificar, pela análise em HPLC-PAD, compostos derivados de kaempferol e quercetina em Eg e derivados de elagitaninos, como punicalina, em Pg. A associação de ambos os fitoterápicos ao adesivo (**AD/Eg ou AD/Pg**) reduziram significativamente o biofilme sobre a superfície da resina, em comparação ao grupo

AD. Considerando os corpos de prova tratados, o período inicial (3 horas) apresentou os melhores resultados em relação à inibição do crescimento fúngico, comparando-se com os outros períodos. **Conclusão:** Possivelmente, o potencial antimicrobiano de *Eg* e de *Pg* está associado a compostos como flavonoides e taninos, respectivamente. Por fim, é possível que a associação destes fitoterápicos ao adesivo protético COREGA® poderá constituir uma alternativa temporária, viável e inovadora para auxiliar no tratamento e/ou prevenção da EP, desde que a manutenção das propriedades inerentes deste adesivo seja comprovada após estudos posteriores.

Palavras-chave*: Arcada Edêntula. Estomatite sob Prótese. Prótese Total. Adesivos Teciduais. Fitoterapia. *Equisetum*. Punicaceae. *Candida albicans*.

*Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), disponíveis no domínio <http://decs.bvr.br/>

ABSTRACT

***Equisetum giganteum* and *Punica granatum* Linn associated with denture adhesive: antimicrobial activity against *Candida albicans* biofilms**

Denture adhesives inhibit inflammation of the underlying mucosal tissue and can receive, in their composition, antimicrobial components, reducing the risk of development of denture stomatitis (DS), a disease related mainly to the colonization of the prosthesis by the fungus *Candida albicans*. It has been reported the antifungal activity of herbal medicines, which may help in the treatment of DS. **Objective:** To realize the phytochemical study of potentially active substances of *Equisetum giganteum* (*Eg*) ("Cola de caballo") and *Punica granatum* Linne (*Pg*) (Pomegranate) and evaluate in vitro the incorporation of hydroalcoholic extracts of *Eg* and *Pg* to a denture adhesive (COREGA®) influences the development *C. albicans* biofilm (SC5314) on the surface a polymerized acrylic resin (Lucitone 550). **Material and Methods:** After identification of compounds of the herbal by HPLC-PAD, the fraction and the concentration were selected by minimum inhibitory concentration (MIC). Biofilms were induced for 3, 6 or 12 hours on the surface of acrylic resin specimens, previously subjected to treatment with the adhesive associated with herbal (**AD/Eg or AD/Pg**). As controls, samples were treated with adhesive (**AD**), adhesive/nystatin association (**AD/Nt**) or not received treatment (**PBS**). The antimicrobial activity was evaluated by quantifying the biofilm using counting colony forming units per milliliter (CFU/mL) and by reduction percentage of fungal metabolic activity using colorimetric assay – XTT (2,3 Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenil) – 5 - [(Phenyl-Amino) Carbonyl] – 2H - Tetrazolium Hidroxide). The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation, and subjected to Kruscal-Wallis test for CFU/mL and Mann-Whitney or 2-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD post-hoc test and Dunnett test for XTT. The mean values obtained by the two methods (CFU/mL and XTT) were submitted to Spearman correlation test ($\alpha=0,05$). **Results:** It was possible to identify, by the analysis on HPLC-PAD, compounds derived from kaempferol and quercetin in *Eg* and ellagitannins derivatives, as punicalin in *Pg*. The combination of both herbal medicines to the adhesive (**AD/Eg or AD/Pg**) significantly

reduced the biofilm on the surface of the resin, compared to the **AD** group. Accordingly, there was an increase in the percentage of reduction of the metabolic activity of biofilm at all periods in the presence of herbal medicines. Considering the treated specimens, the initial period (3 hours) showed the best results in relation to inhibition of fungal growth compared with other periods. **Conclusion:** Possibly, the antimicrobial potential of *E. giganteum* and *P. granatum* is associated with compounds such as flavonoids and tannins, respectively. Finally, we suggest that the combination of these herbal medicines to COREGA® prosthetic adhesive may be a temporary, viable and innovative alternative to assist in the treatment and/or prevention of DS, since the maintenance of the inherent properties of this adhesive is proven after further studies.

Keywords*: Jaw, Edentulous. Stomatitis, Denture. Denture, Complete. Tissue Adhesives. Phytotherapy. *Equisetum*. Punicaceae. *Candida albicans*.

*In accordance with Health Sciences Descriptors (DeCS) available at <http://decs.bvr.br/>

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Fração acetato de etila
AD	Adesivo protético COREGA®
AD/Eg	Adesivo protético associado a <i>E. giganteum</i>
AD/Nt	Adesivo protético associado a Nistatina
AD/Pg	Adesivo protético associado a <i>P. granatum</i>
céls/mL	Células por mililitro
CH ₂ Cl ₂	Fração diclorometânica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
°C	Graus Celsius
d.i	Diâmetro interno
DMSO	Dimetilfulfóxido
DO	Densidades Ópticas
Eg	<i>Equisetum giganteum</i>
ELL	Extração Líquido-Líquido
EP	Estomatite Protética
EtOH 70%	Álcool 70 por cento (Extrato Bruto)
g	Gramas
h	Horas
HPLC-PAD	<i>High Performance Liquid Chromatography – Photodiode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
H ₂ O	Água
Kg	Quilogramas
kgf	Quilograma força
L	Litros
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
mg/mL	Miligramas por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros

mm/s	Milímetros por segundo
mM	Micromolar
°n	Número
<i>n</i> -BuOH	Fração butanólica
n.i	Não identificados
nm	Nanometros
Nt	Nistatina
PBS	Solução Salina Tamponada em Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Pg	<i>Punica granatum</i>
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	Politetrafluoroetileno (<i>Teflon</i>)
PTR	Prótese Total Removível
®	Marca registrada
Ra	Rugosidade aritmética
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Trípico de Soja)
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
µL	Microlitros
µm	Micrometros
UNBA	Herbário da UNESP de Bauru
UV	Ultravioleta
YEPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
XTT	(2,3 Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenil) -5- [(Phenyl-Amino) Carbonyl] – 2H- Tetrazolium Hidroxide)
%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	35
2.1	Estomatite Protética (EP).....	35
2.2	Formação de Biofilme de <i>C. albicans</i>	36
2.3	Considerações Gerais sobre os Adesivos Protéticos.....	40
2.4	Composição, mecanismo de ação e características de um adesivo protético ideal.....	43
2.5	Adesivos Protéticos e a EP.....	47
2.6	Tratamento da EP e suas limitações.....	49
2.7	A utilização de fitoterápicos: <i>Equisetum giganteum</i> e <i>Punica granatum</i> ...	52
3	PROPOSIÇÃO.....	63
3.1	Objetivos Específicos.....	63
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1	Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos.....	67
4.2	Obtenção das frações de <i>E. giganteum</i> e <i>P. granatum</i> por Extração Líquido-Líquido (ELL).....	69
4.3	Identificação dos Compostos por HPLC – PAD.....	71
4.4	Escolha da fração e da concentração de <i>E. giganteum</i> e <i>P. granatum</i>	71
4.5	Confecção dos corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável.....	72
4.6	Tratamento da superfície dos corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável.....	77
4.7	Manipulação de <i>C. albicans</i> SC5314: obtenção da pré-cultura e padronização do inóculo.....	80
4.8	Desenvolvimento do biofilme de <i>C. albicans</i> sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente tratados.....	82

4.9	Quantificação do biofilme de <i>C. albicans</i> aderido sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente tratados ou não com a associação adesivo/ <i>E. giganteum</i> ou <i>P. granatum</i> por meio das unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	83
4.10	Avaliação da atividade metabólica do biofilme de <i>C. albicans</i> aderido sobre a superfície de corpos de prova tratados ou não com a associação adesivo/ <i>E. giganteum</i> ou <i>P. granatum</i> pelo ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT.....	85
4.11	Análise dos resultados.....	88
5	RESULTADOS.....	93
5.1	Estudo fitoquímico de substâncias potencialmente ativas de <i>E. giganteum</i> e de <i>P. granatum</i>	93
5.1.2	Identificação por HPLC-PAD.....	93
5.2	Quantificação do biofilme fúngico formado sobre a superfície da resina acrílica termopolimerizável, previamente tratada com a associação adesivo/ <i>E. giganteum</i> ou <i>P. granatum</i> , por meio das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).....	101
5.3	Redução da atividade metabólica do biofilme fúngico formado sobre a superfície da resina acrílica termopolimerizável, previamente tratada com a associação adesivo/ <i>E. giganteum</i> ou <i>P. granatum</i> , por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT.....	104
6	DISCUSSÃO.....	111
7	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS.....	127

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O edentulismo ainda representa um problema significativo de saúde pública para a terceira idade, sendo frequentemente negligenciado em países em desenvolvimento (FELTON, 2009; FERENCZ; FELTON, 2009). Embora a taxa de edentulismo esteja diminuindo, o número de usuários de próteses totais removíveis (PTR), geralmente os idosos, tem crescido mediante o aumento da expectativa de vida (DOUGLASS; SHI; OSTRY, 2002). No Brasil, mais da metade da população edêntula procura tratamento por meio da utilização de próteses removíveis, totais ou parciais (FONSECA et al., 2013).

A população idosa, no geral, apresenta peculiaridades que requerem uma atenção especial para a obtenção de saúde geral e bucal. Uma das lesões mais prevalentes em usuários de PTR é a estomatite protética (EP), uma doença crônica que pode ser caracterizada por uma inflamação localizada ou generalizada da mucosa bucal, considerada de difícil tratamento devido à sua etiologia multifatorial. Tal patologia, tem sido associada à alergia ao monômero residual, ao trauma causado pela prótese total, a fatores sistêmicos como deficiências nutricionais, diabetes, xerostomia, imunossenescência e imunossupressão e, principalmente, ao acúmulo de biofilme microbiano contendo o fungo *Candida albicans* na superfície interna das próteses (BUDTZ-JORGENSEN, 1978; KOREG, 1991; IACOPINO; WATHEN, 1992; ALLEGRA; GENNARI, 2000; HUANG; WU, 2005).

A utilização de PTR por longos períodos torna um facilitador na iniciação da EP (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; MIMA et al., 2012), pois as PTR podem bloquear o fluxo salivar e a ação mecânica de limpeza proporcionada pela língua, resultando um ambiente aeróbico e acidulado, facilitando a proliferação de microrganismos e a formação de biofilmes (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; MAHONEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998). O uso prolongado de PTR exerce pressão contínua sobre os tecidos (ósseo e mucoso), o que pode aumentar a susceptibilidade dos usuários a infecções como aquelas associadas a EP. Além disso, as espécies de *Candida* possuem capacidade de adesão à resina acrílica da base das próteses, colonizando-a em profundidade (DAVENPORT, 1970; BUDTZ-JORGENSEN, 1990; CHAU et al., 1995). Sendo assim, as PTR constituem-se em reservatórios microbianos (SILVA; PARANHOS; ITO, 2002).

A forma tradicional de tratamento da EP consiste na prescrição de terapias antifúngicas tópicas e/ou sistêmicas. Estes fármacos possuem basicamente o mesmo mecanismo de ação, ou seja, inibição da síntese de ergosterol em fungos patogênicos, aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática das células fúngicas e consequente perda de constituintes intracelulares, seguido de morte celular (CAMPAGNOLI et al., 2004). Porém, este tratamento apresenta limitações devido ao fato de que os antifúngicos sistêmicos, como os azólicos, e os convencionais locais, como as variadas formulações a base de nistatina, não conseguem atuar efetivamente sobre a superfície interna das próteses contaminadas (BARBEAU et al., 2003), embora sejam eficientes no alívio dos sinais e sintomas da EP (BANTING; HILL, 2001).

Ainda, o uso contínuo desses antifúngicos inclui efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos (LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993), bem como o aparecimento de resistência microbiana, uma vez que recidivas da EP geralmente ocorrem após a interrupção do uso da medicação (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995; BARBEAU et al., 2003). Por fim, a prevenção desta patologia deve ser direcionada a procedimentos que minimizem a colonização de biofilmes sobre a superfície acrílica interna das PTR (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; WEBB et al., 1998b; NEPPELENBROEK et al., 2008; MIMA et al., 2012).

Quanto aos antifúngicos tópicos, deve ser considerado ainda os efeitos colaterais, como as reações alérgicas e náuseas devido ao sabor extremamente desagradável (NEVILLE et al., 2009). Sendo assim, a interrupção do tratamento pelos usuários de PTR, em função dos efeitos colaterais, também favorecem a recidiva da EP. Em comparação com os antifúngicos convencionais utilizados no tratamento da EP, acredita-se que a fitoterapia seja uma alternativa terapêutica isenta de efeitos adversos e/ou incapaz de causar interações medicamentosas (ERNST et al., 1995).

Os adesivos protéticos são amplamente utilizados para aumentar a retenção e a estabilidade das próteses removíveis, sobretudo das totais superiores (ADSMAN, 1989; FOLSE, 2004). Ainda, tem sido relatado que o uso de adesivos protéticos resulta em diminuição da pressão sobre os tecidos de suporte, promovendo a distribuição das forças oclusivas e reduzindo a pressão localizada em um único ponto, minimizando o trauma tecidual, a irritação na mucosa (SHER; RITCHIE; FLOWERS, 1978; BOONE, 1984; PEREZ; KAPUR; GARRETT, 1985;

TARBET; BOONE; SCHMIDT, 1980; TARBET; SILVERMAN; SCHMIDT, 1990) e, principalmente, o risco de desenvolver a EP.

Adesivos têm sido comercializados em diversas formulações tais como pós, pastas ou cremes para adesivos solúveis, bem como tiras ou almofadas para adesivos insolúveis (PRADIES; SANZ; EVANS, 2009). Sua composição continua a mudar a medida que os fabricantes visam melhorar seus produtos. Os ingredientes ativos dos adesivos, aqueles que proporcionam a propriedade adesiva, são uma mistura de sais de polímero com diferentes graus de solubilidade em água (GRASSO, 2004; HAN et al., 2014). Além dos ingredientes ativos, componentes não ativos também podem ser associados aos adesivos protéticos, tais como os aditivos aromatizantes, corantes, conservantes e, principalmente, componentes antimicrobianos (GRASSO, 2004; PRADIES SANZ; EVANS, 2009).

Relatos na literatura demonstram que extratos de plantas apresentam atividade antimicrobiana sobre patógenos bucais, principalmente contra *C. albicans* (KOO et al., 2000a; VASCONCELOS et al., 2006; SAMET et al., 2007; PAIVA et al., 2008, DA SILVA et al., 2008; BRAGA et al., 2008; ENDO et al., 2010; PEREIRA et al., 2011a; ALAVARCE et al., 2015), patógeno comumente associado à EP. Assim, estas plantas medicinais podem desempenhar um papel importante no tratamento e na prevenção desta patologia (NAQVI et al., 1991; DANTAS et al., 2009; CASAROTO; LARA, 2010). No geral, estas plantas medicinais apresentam compostos que possuem atividade antimicrobiana e o interesse sobre a sua identificação tem crescido nos últimos anos (ENDO et al., 2010; ANIBAL et al., 2013).

Sendo a EP uma patologia relacionada à colonização, principalmente pelo fungo *C. albicans* (na forma de biofilmes altamente resistentes aos tratamentos convencionais) e ao uso de PTR, geralmente por idosos, que naturalmente apresentam um comprometimento do seu sistema imune, é importante e crucial a criação de alternativas antifúngicas, que apresentem menor custo e menos efeitos colaterais que os medicamentos sintéticos.

Já que os adesivos protéticos podem ser associados a componentes não ativos, baseamo-nos na hipótese de que estes materiais, associados a fitoterápicos com potencial antimicrobiano, poderiam apresentar vantagens adicionais, além daquelas já existentes como melhora da capacidade mastigatória e redução do trauma. Supostamente, tais fitoterápicos poderiam impedir a aderência e/ou

combater o principal microrganismo envolvido com a EP, o fungo *C. albicans*. Assim, esta associação adesivo protético/fitoterápicos poderá constituir uma alternativa útil, eficaz e complementar para o tratamento da EP, além da retenção e conforto da PTR na boca.

Considerando estes aspectos, este trabalho avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Equisetum giganteum* e de *Punica granatum* Linné, quando associados ao adesivo protético em pó COREGA[®], frente ao biofilme de *C. albicans*.

2 *Síntese Bibliográfica*

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estomatite Protética (EP)

Uma das lesões mais prevalentes em portadores de próteses totais removíveis é a EP (BUDTZ-JORGENSEN, 1978). Considerada a forma mais comum de candidose oral, tem sido relatada em 11 a 67% dos usuários de próteses removíveis (BARBEAU et al., 2003; RAMAGE et al., 2004; BARNABE et al., 2004; WEBB et al., 1998a; THOMAS; WHITTLE, 2005; FIGUEIRAL et al., 2007; GENDREAU; LOEWY, 2011; SALERNO et al., 2011). Doença inflamatória crônica, a EP pode se manifestar clinicamente através de diferentes níveis de inflamação e eritema nos tecidos de suporte das próteses, variando de múltiplos pontos hiperêmicos a áreas eritematosas e hiperplasia papilar (NEWTON, 1962). A EP, geralmente, apresenta-se assintomática, entretanto, quando os sinais e sintomas estão presentes manifesta-se em forma de sangramento da mucosa bucal, inchaço, prurido, desconforto, ardor, halitose, gosto desagradável e xerostomia, além de lesões associadas, como queilite angular e glossite romboidal média (ARENDORF; WALKER, 1987; BUDTZ-JORGENSEN, 1974; JEGANATHAN; LIN, 1992; SALERNO et al., 2011)

Esta patologia bucal pode estar associada a fatores locais ou sistêmicos. Dentre os fatores locais estão o trauma causado pela prótese, xerostomia, higiene inadequada, próteses antigas e mal adaptadas e o uso contínuo das mesmas, principalmente, no período noturno (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; WEBB et al., 1998a; WEBB et al., 1998b; THOMAS; WHITTLE, 2005; FIGUEIRAL et al., 2007; NEPPELENBROEK et al., 2008; MARTORI et al., 2014). Dentre os fatores sistêmicos estão a alergia ao monômero residual, deficiências nutricionais, diabetes, senilidade, endocrinopatias, imunossupressão e o uso crônico de antibióticos de amplo espectro (BUDTZ-JORGENSEN, 1978; IACOPINO; WATHEN, 1992; ALLEGRA; GENNARI, 2000; FIGUEIRAL et al., 2007). Muitos usuários de próteses removíveis desconhecem que têm EP, o que pode levar a um risco potencial de complicações a longo prazo, principalmente se esta patologia estiver associada a um quadro de debilidade imunológica (COCO et al., 2008).

Embora sua etiologia seja considerada multifatorial (BUDTZ-JORGENSEN, 1978), a maioria dos estudos afirma que a infecção por *Candida*

representa o principal fator etiológico associado a esta patologia (BUDTZ-JORGENSEN; BETRAM, 1970; ARENDORF; WALKER, 1987, BANTING; HILL, 2001; RAMAGE et al., 2004; MARTORI et al., 2014; SHARMA; HEGDE, 2014). Este fungo age como patógeno oportunista, especialmente quando a resistência do hospedeiro é superada pela virulência e a carga fúngica deste microrganismo (BILHAN et al., 2009; SALERNO et al., 2011).

2.2 Formação de Biofilme de *C. albicans*

Fungos do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal dos mamíferos e são encontrados em superfícies mucosas da cavidade bucal, vaginal e do trato gastrointestinal, em aproximadamente metade dos indivíduos saudáveis, como comensais, ou seja, incapazes de induzir qualquer resposta inflamatória nos tecidos adjacentes, não causando danos aparentes (ELAHI et al., 2000; AKPAN; MORGAN, 2002). Entretanto, sobre certas condições predisponentes, como o imunocomprometimento, este fungo pode multiplicar-se, passando do estado comensal para o patogênico. Neste caso, o fungo poderá penetrar nos tecidos do hospedeiro, por meio da alteração da sua morfologia, de levedura para micélio ou hifa e ativar assim o processo inflamatório, seguido de destruição tecidual. A transição de levedura para hifa depende tanto da expressão de fatores de virulência como da susceptibilidade do hospedeiro (ROGERS; BALISH, 1980; BUNETEL; BONNAURE-MALLET, 1996; DONGARI-BAGTZOGLOU; JORGE; BATISTA; REGO, 2000; FIDEL, 2005).

C. albicans, em particular, possui capacidade de formar biofilmes, que consistem em camadas de células microbianas embutidas dentro de uma matriz de material polimérico extracelular produzido por eles mesmos (TUNNET; GORMAN; PATRICK, 1996; HAWSER; DOUGLAS, 1994; DONLAN, 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002; PETERS et al., 2010 e podem ser observados em aparelhos ortodônticos, assim como em cateteres e válvulas cardíacas artificiais, mas principalmente, sobre a resina acrílica das PTR (HE et al., 2006; RAMAGE; MARTÍNEZ; LOPÉZ-RIBOT, 2006; COULTHWAITE; VERRAN, 2007; SHINDE, 2012).

De um modo geral, 65% das infecções microbianas envolvem a presença de biofilmes; por esta razão, eles apresentam importante relevância clínica

especialmente devido a alta resistência a antibióticos e a antifúngicos (RAMAGE et al., 2001). Biofilmes são comunidades biológicas, que podem se aderir em qualquer superfície úmida e sólida, seja ela biótica ou abiótica. São encontrados na natureza com um elevado grau de organização, onde microrganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Sendo assim, a associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, quando comparado a sua forma planctônica, favorecendo relações cooperativas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis como pele, e mucosas, dentes e próteses, influenciando a saúde do paciente (MARRIOT; NOVEER, 2004; PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010). Particularmente, biofilmes de *C. albicans* aderidos a superfícies abióticas, como a superfície da resina acrílica de PTR, parecem ter seu desenvolvimento e arquitetura distintos (BAILLIE; DOUGLAS, 1999; CHANDRA et al., 2001a; RAMAGE et al., 2001).

A adesão de *Candida* spp., principalmente *C. albicans*, à superfície da resina é um evento primário e necessário para a sua colonização e o desenvolvimento da EP. Esta adesão envolve alguns componentes da parede celular do fungo, como: manose, manoproteínas, sacarinas e adesinas (NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998). Além disso, a adesão do biofilme em próteses removíveis também é modulada por fatores relacionados ao hospedeiro, como os fluidos corporais, tais como saliva e muco, que formam uma película condicionante (HABASH et al. 1999), que facilita a adesão microbiana, além do pH e presença de fungos no meio bucal (AGUIRRE et al., 1996) e o imunocomprometimento do paciente (HUANG; WU, 2005; KOREG, 1991). Após a adesão, inicia-se o processo de formação/desenvolvimento do biofilme, o qual é variável e dependente da cepa clínica de *Candida* spp. (NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998; CANNON; CHAFFIN, 2001; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2013).

O desenvolvimento de biofilmes microbianos é um processo complexo e influenciado por fatores como: as condições do meio, o tipo de microrganismo e as propriedades físico-químicas da superfície do biomaterial, como a superfície de resina acrílica das PTR (XU; SIECLECKI, 2015). A quantidade de sítios de ligação disponíveis na parede celular microbiana, a expressão de fatores de virulência, como as proteases (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; NAGLIK et al., 2008; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2013), e o tamanho da superfície de contato do material

no qual os microrganismos possuem acesso, são condições importantes para a formação do biofilme (XU; SIECLECKI, 2012; XU; SIECLECKI, 2014).

Tem sido sugerido que as formas miceliais aumentam a atividade patogênica de *C. albicans* por propiciar maior aderência à resina acrílica das próteses, e assim aumenta o processo invasivo na mucosa bucal (RAMAGE et al., 2004; WEBB et al., 1998b). A gravidade da EP é maior com a presença abundante de formas miceliais de *Candida* spp. (SALERNO et al., 2011). Os filamentos desse tipo de morfologia dificultam a ação fagocitária pelo sistema imune, o que contribui ainda mais para o desenvolvimento de manutenção da infecção (IACOPINO; WATHEN, 1992). Todos estes fatores podem ser exacerbados por *C. albicans*, considerada como a mais virulenta e patogênica das espécies de *Candida* (SALERNO et al., 2011).

As PTR apresentam rugosidades e microporosidades que facilitam a adesão de microrganismos (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997), pois o crescimento em forma micelial de *Candida* spp. permite que este fungo se desenvolva no interior das ranhuras formadas, protegendo-se de forças internas de remoção como o efeito autolimpante da saliva e da escovação (SAMARANAYAKE; MCCOURTIE; MACFARLANE, 1980). Ainda, a superfície interna das PTR pode sofrer deterioração por soluções higienizadoras, apresentando valores de rugosidade bem superiores a 0,2 μm , o que a torna passível de contaminação, auxiliando no processo de formação de biofilmes (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997).

Além do mais, tal resina apresenta carga positiva e alta energia de superfície, fazendo com que glicoproteínas salivares com carga negativa sejam rapidamente atraídas formando uma estrutura semelhante a uma película, com forte adesão química a resina (SESMA et al., 2005). Neste contexto, Ramage et al. (2012) verificaram que estes fungos têm sido isolados em superfícies resinosas de próteses removíveis, sugerindo que *C. albicans* adere e forma biofilmes preferencialmente em polimetilmetacrilato (PMMA), o principal componente da resina acrílica que compõe as próteses removíveis.

A formação do biofilme de *C. albicans* em lâminas de PMMA procede em três distintas fases de desenvolvimento: a) fase inicial (0 a 11 horas), b) fase intermediária (aproximadamente 12 a 30 horas), e c) fase de maturação (aproximadamente 38 a 72 horas). Um estudo sobre a formação de biofilme de *C.*

albicans com enfoque em seu desenvolvimento, arquitetura e resistência a drogas demonstrou que, inicialmente, as células leveduriformes de *C. albicans* se aderem à superfície da lâmina, formando microcolônias. Nas primeiras 11 horas, as comunidades de *C. albicans* aparecem como uma camada de células, devido ao crescimento e agregação das colônias. Já o desenvolvimento da fase intermediária é caracterizado pela emergência e predominância de substância não celular (polimérica), a qual se assemelha a uma “névoa” que forma um filme e cobre as microcolônias do fungo. Durante a fase de maturação, a quantidade de substância polimérica extracelular aumenta com o tempo de incubação e as comunidades de *C. albicans* são completamente cobertas por essa substância (CHANDRA et al., 2001a).

Ramage et al. (2001) descreveram as características do biofilme de *C. albicans* em relação à morfologia, adesão e susceptibilidade antifúngica, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica confocal a laser (MECL) e o ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio (XTT). O desenvolvimento do biofilme foi observado em placas de 96 poços pré-tratadas ou não com soro ou saliva em intervalos de 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas. As primeiras 2 horas foram caracterizadas pela adesão inicial das células seguida por germinação e formação de microcolônias (2 a 4 horas), filamentação (4 a 6 horas), desenvolvimento da monocamada (6 a 8 horas), proliferação (8 a 24 horas) e maturação (24 a 48 horas). Nesse trabalho, o ensaio XTT demonstrou uma relação linear entre a densidade celular do biofilme e a atividade metabólica.

Os componentes responsáveis por um dos ensaios colorimétricos de redução ao corante formazan são os sais de tetrazólio. Estes sais são compostos orgânicos heterocíclicos que substituem o aceptor natural de elétrons (O_2) nos processos biológicos de redução. Os sais de tetrazólio são reduzidos a compostos derivados do formazan por meio da aceitação de elétrons por ação enzimática (de substâncias do sistema de transporte de hidrogênio) ou por ação química (de transportadores de elétrons artificiais). No método que utiliza os sais de tetrazólio (XTT), a redução a formazan em células metabolicamente ativas ocorre no citocromo P-450 por meio da ação das desidrogenases mitocondriais e das oxidases das flavoproteínas. A ação dessas enzimas resulta na clivagem do anel de tetrazólio solúvel em água do XTT, produzindo formazan de cor laranja (TELLIER et al., 1992; HAWSER, 1996; HAWSER et al., 2001; MELETIADIS et al., 2001; KUNH et al.,

2003). Como a bioedução do XTT puro é ineficiente, utiliza-se, geralmente, a menadiona como transportador de elétrons artificial para permitir, dessa forma, a reação entre as células e o sal (STEVENS; OLSEN, 1993; HAWSER et al., 2001). O XTT, sendo solúvel em água, propicia de forma relativamente simples a quantificação por espectrofotometria em sobrenadantes celulares. Este aspecto é importante na avaliação de biofilmes porque permite efetuar análises de susceptibilidade e atividade celular sem promover danos a sua estrutura (KUNH et al., 2003). Sendo assim, o ensaio XTT apresenta-se como uma alternativa útil quando associado a outros métodos quantitativos de avaliação de biofilmes que podem promover danos a estrutura da célula.

2.3 Considerações Gerais sobre os Adesivos Protéticos

No Brasil, a principal característica do crescimento do grupo populacional com mais de 65 anos de idade é a rapidez com que o mesmo se processa. As projeções indicam que o país inicia o século XXI com a população idosa crescendo quase oito vezes mais que a de jovens e quase duas vezes mais que a população em geral (MARCHINI et al., 2001). Dados da pesquisa nacional de condições sobre a saúde bucal, publicada em 2004 pelo Ministério da Saúde, revelaram que 57,9% dos brasileiros na faixa entre 60 e 74 anos utilizam prótese total removível superior e que 34,2% utilizam prótese total removível inferior (PIUVEZAM; DE LIMA, 2013).

O envelhecimento juntamente com a ocorrência de perdas dentárias, proporciona o aparecimento de uma relação complexa entre a qualidade de vida e a saúde bucal na terceira idade, o que tem um impacto relevante sobre as atividades diárias; isso pode ocorrer não apenas como resultado direto das funções alteradas resultantes das perdas dentárias, mas possivelmente também como resultado das mudanças na percepção e nos valores que ocorrem com o aumento da idade (STEELE et al., 2004).

A literatura indica que o edentulismo é uma experiência traumática, exigindo adaptação social e psicológica do idoso na sociedade (BERGENDAL, 1989; FERREIRA, 2006; THORSTENSSON; JOHANSSON, 2010). Portanto, de acordo com Silva et al. (2010), é importante discutir o impacto da perda dentária na qualidade de vida de usuários de próteses totais.

Levando em consideração a situação socioeconômica da grande maioria da população em países em desenvolvimento, o uso de implantes muitas vezes torna-se economicamente inviável (DOUGLASS; SHI; OSTRY, 2002; HEYDECK et al., 2003). As próteses totais podem ser consideradas uns dos principais recursos para a reabilitação bucal dos pacientes totalmente edêntulos. A reabilitação bucal com próteses totais convencionais evidencia resultados clínicos positivos, entretanto, é comum o relato, pelos usuários, de desconforto, dor, inflamação gengival, problemas fonéticos e limitações funcionais que incluem mastigação inadequada, instabilidade e falta de retenção, principalmente em relação às próteses inferiores (AWAD, et al., 1998; HEYDECK et al., 2003). Sendo assim, tendo em vista as características descritas anteriormente, estes pacientes podem evitar estes efeitos indesejáveis fazendo uso dos adesivos protéticos.

Tradicionalmente, uma grande parcela dos clínicos apresenta uma atitude negativa com relação aos adesivos protéticos e, frequentemente, se recusam a indicá-los por considerarem a sua utilização como a última alternativa para solucionar os problemas do paciente edêntulo (GRASSO, 2000), embora o uso apropriado e moderado dos adesivos melhore a função e a retenção das próteses (FOLSE, 2004).

Desta forma, a prótese removível convencional, associada ao benefício adicional que os adesivos protéticos promovem em relação a adaptação e/ou retenção da prótese, é considerada a forma de tratamento para a maioria dos edêntulos. Entretanto, os pacientes devem ser alertados sobre os riscos do uso e do mau uso dos adesivos, para que possa usufruir ao máximo dos benefícios, sem agredir ou mascarar a saúde dos tecidos bucais (KUMAR; THOMBARE, 2011).

A utilização de adesivos protéticos, fixadores ou adeptos, começou quase ao mesmo tempo com a Era da Odontologia Moderna no final do século XVIII. A literatura odontológica, antes do século XIX, não referenciava os adesivos ou fixadores. A *American Dental Association* denominou este material como não medicinal, junto ao conselho de materiais odontológicos. A patente mais antiga para “fixador de dentadura” é datada de 1913, tendo em seguida outras em 1920 e 1930. Eles, aparentemente, não faziam parte do arsenal do cirurgião-dentista e, portanto, nenhuma menção foi feita à sua utilização (YANKEL, 1984; ADISMAN, 1989).

Os adesivos protéticos surgiram quase ao mesmo tempo que as próteses totais. Embora o uso de adesivos protéticos seja um tema controverso no

ramo da Odontologia, milhões de usuários de próteses totais continuam a comprar e a fazer uso dos adesivos. Em 1980, 15% dos usuários de próteses utilizavam adesivos protéticos nos EUA (ADISMAN, 1989).

As PTR acabam causando danos aos tecidos e mucosas de suporte pela pressão contínua exercida através do seu uso prolongado. Estes danos podem tornar os pacientes suscetíveis a EP. Por outro lado, estes pacientes podem se beneficiar fazendo uso destes adesivos, pois a pressão que a prótese exerce com o adesivo é menor do que a pressão exercida sem ele; assim a distribuição de forças que o adesivo proporciona reduz a pressão localizada em um único ponto, diminuindo o trauma tecidual e a irritação na mucosa, fatores esses que predisõem a EP (TARBET; SILVERMAN; SCHMIDT, 1981).

Além deste benefício, os adesivos protéticos acabam conferindo segurança aos pacientes, tanto física como psicológica, pois são considerados artifícios valiosos na obtenção da retenção, estabilidade e eficácia sobre a função mastigatória. Porém, é necessário fazer o uso consciente destes materiais, uma vez que existe o risco de mascarar lesões neoplásicas. Com o crescimento destas lesões e a mudança dos tecidos de suporte, a prótese pode não mais se adaptar ao tecido bucal, e conseqüentemente o paciente faz o uso descontrolado do adesivo para manter a prótese em função, o que impossibilita o reconhecimento da referida lesão (GRASSO, 2004).

Inicialmente, a eficácia quanto a função mastigatória proporcionada pela utilização dos adesivos protéticos foi questionada (KRISHAN, 1967). Décadas depois, juntamente com o avanço tecnológico, foi analisado o efeito dos adesivos na estabilidade e função mastigatória de próteses totais, utilizando um sistema 3-D óptico de captura de movimentos, que é capaz de reconhecer múltiplos alvos em movimento. Durante o movimento de mastigação, os adesivos aplicados tendem a reduzir os movimentos das próteses, e a diminuir os movimentos rotacionais e o tempo de mastigação. Sendo assim, os pesquisadores concluíram que os adesivos protéticos contribuem para a redução dos movimentos das próteses e melhoram a capacidade mastigatória (HOSEGAWA; TOSHIKI; HAYAKAWA, 2003).

Atualmente, as pesquisas demonstraram que a utilização dos adesivos pode melhorar a qualidade da mastigação de pacientes usuários de próteses totais, uma vez que permitem a trituração mais eficiente dos alimentos ingeridos na dieta,

por meio do aumento da retenção das próteses na mucosa de suporte (FOLSE, 2004; SATO; KAIBA; HAYAKAWA, 2008; BARTLETT et al., 2013).

2.4 Composição, mecanismo de ação e características de um adesivo protético ideal

A composição dos adesivos continua a mudar, a medida que os fabricantes visam melhorar a eficácia desses produtos. Grasso (2004) dividiu os adesivos protéticos, mediante a sua composição, em solúvel e insolúvel. O grupo insolúvel inclui as tiras sintéticas conhecidas como "pads" ou "syntheticwafers", que vem a ser tornar adesivos quando hidratados. Entre os adesivos solúveis estão o creme, a pasta e pó. A grande diferença nos adesivos solúveis está no veículo e no componente aglutinante.

Os adesivos apresentam componentes ativos e não ativos. Os ingredientes ativos são aqueles que conferem as propriedades adesivas e os componentes não ativos são aqueles que não participam do processo de adesão dos adesivos, podendo então estar associados a agentes antimicrobianos, além de aditivos aromatizantes, corantes e conservantes (GRASSO, 2004; PRADIES et al., 2009).

Ainda assim, a composição dos adesivos pode ser dividida em três grupos: Grupo 1, consiste em materiais responsáveis pelas propriedades adesivas, tais como goma de Karaya, goma adragante, goma arábica, pectina, gelatina, metilcelulose, hidroximetilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e os polímeros sintéticos (óxido de polietileno, acrilamidas, polivinil acético). O Grupo 2 contém agentes antimicrobianos tais como o hexaclorofeno, tetraborato de sódio, borato de sódio e etanol. O Grupo 3 contém os aditivos umectantes, agentes plastificantes, como o óleo de gaultéria e o óleo de hortelã-pimenta, e outros agentes semelhantes em estrutura aos agentes aromatizantes (POLYTOIS, 1983; AMERICAN DENTAL ASSOCIATION, 1984, POLYZOIS et al., 2013).

Em particular, antigamente, um dos componentes presentes no adesivo era o zinco, o qual foi introduzido em misturas de copolímeros, como proposto por Shah e colaboradores (1988), para estabilizar o adesivo na prótese e atuar como agente antimicrobiano. Esta incorporação no adesivo foi licenciada em 1990 pela empresa Procter & Gamble. Empresas, como a BlockDrugCo, adicionaram zinco em

seus adesivos em 1996. No entanto, esta formulação foi retida pela empresa GlaxoSmithKline (GSK), quando a mesma comprou a BlockDrugCo em 2001, por causa do aumento no número de efeitos adversos relatados pelos usuários e relacionados a ingestão de excesso de zinco, causando problemas neurológicos. Sendo assim, a empresa GSK enviou uma carta de advertência a todos os prestadores de cuidados de saúde em 18 de fevereiro de 2010, anunciando que a empresa deixaria de fabricar ou vender adesivos contendo zinco, para evitar futuros problemas potenciais aos usuários. Atualmente, GSK comercializa adesivos protéticos alternativos isentos de zinco (TEZVERGIL-MUTLUAY; CARVALHO; PASHLEY, 2010).

Os componentes do Grupo 1, tais como goma vegetal de acácia, tragacanto, Karaya ou carboximetilcelulose, estão envolvidos, principalmente, na união e retenção da prótese à área edêntula, aumentando a estabilidade das próteses totais (GHANI; PICTON; LIKEMAN, 1991). Por serem hidratos de carbono, quando entram em contato com a água, incham e aumentam de volume em relação ao seu volume original, adquirindo aspecto viscoso e retraindo algumas propriedades de sua composição (REITHER, 1957).

A efetividade dos adesivos depende de forças químicas e físicas (ELLIS AL-NAKASH; LAMB, 1980), baseada no princípio de Stefan (2004), a força necessária para puxar dois discos ou pratos é diretamente proporcional a viscosidade do líquido entre eles. Neste sentido, a maioria dos componentes gera uma bioadesão via grupo carboxila; como o adesivo hidrata, os grupos carboxílicos livres formam uma adesão eletrovalente, produzindo a adesão em si (GRASSO, 1996).

Os adesivos protéticos, uma vez que aplicado nas próteses e em contato com a mucosa subjacente, são capazes de manter a prótese em posição por meio de forças retentivas. O volume do adesivo é alterado ao entrar em contato com meio aquoso, aumentando de 50% a 150% o seu volume, conseguindo preencher o espaço existente entre a prótese e a mucosa subjacente. O adesivo absorve a água graças à atração produzida entre os seus ânions e os cátions da mucosa proteica tecidual. Como a saliva aumenta a viscosidade do adesivo, aumenta assim a força necessária requerida para unir a prótese ao tecido (SHAY, 1991). O adesivo protético na cavidade oral é controlado por uma inter-relação complexa de adesão, coesão, pressão atmosférica, tensão superficial e viscosidade (BARBENEL, 1971;

LINDSTROM et al., 1979). Ele fornece uma interface entre a resina acrílica da base da prótese total e a mucosa oral e, como tal, relaciona estas forças de retenção entre a prótese e a mucosa através de um intermediário constituído por uma fina película de saliva. O aumento da viscosidade do adesivo protético, em comparação com a da saliva, é um fator para o aumento da retenção da prótese na cavidade oral (STAFFORD, 1970).

Graças a esse efeito de preenchimento, o espaço entre a prótese e o tecido é diminuído, minimizando o acúmulo de alimentos entre a mucosa oral e a prótese, reduzindo o odor desagradável produzido e uma possível irritação da mucosa devido ao acúmulo de alimentos na interface prótese/mucosa (TARBET; SILVERMAN; SCHMIDT, 1981). Entretanto, alguns pacientes relatam sensações desagradáveis com respeito à textura, odor e sabor. Também vale ressaltar que, com alguns tipos de adesivos, os pacientes têm encontrado dificuldade em sua utilização (VALLE et al., 2007).

Segundo Adisman (1989), o adesivo ideal para próteses não deve ser tóxico e irritante, e sim biocompatível com a mucosa oral do paciente. Não deve promover o crescimento microbiano e o produto deve ser inodoro, insípido e de fácil aplicação e remoção. O adesivo deve proporcionar conforto, retenção (adesão, coesão) e estabilidade na presença da prótese, garantindo a segurança e a eficácia durante a fala, mastigação, bocejo e sorriso. A característica física ideal é a forma de creme ou gel. Pacientes relataram que o creme adesivo é preferido porque ele é lavado indiretamente pela saliva ao contrário do pó e, além disso, a prótese adere melhor ao creme e esta formulação de adesivo proporciona uma maior durabilidade (WEIDNER-STRSHL, 1984).

A força de aderência e a viscosidade são as propriedades mais importantes de um adesivo protético. De acordo com Adisman (1989), o adesivo ideal deve reter as suas propriedades adesivas durante 12 a 16 horas antes de ser necessária reaplicação. A viscosidade inicial deve permitir a manipulação fácil sem comprometer a força do adesivo. Entretanto, outros estudos relataram que a capacidade de retenção dos adesivos pode permanecer por mais de 8 horas, alcançando a eficácia, na sua capacidade de retenção, 2 a 4 horas após a aplicação, diminuindo subsequentemente (GRASSO; RENDELL; GAY, 1994; OZCAN et al., 2005). Diferentes marcas de adesivos protéticos apresentaram diminuição da força de aderência depois de imersos em água durante 1 a 2 horas, relatados em revisão

sistemática (PAPADIOCHOU; EMMANOUIL; PAPADIOCHOS, 2015). Entretanto, na prática clínica, é necessário que a força de aderência máxima alcance mais de 6 horas.

O aumento do período de eficácia dos adesivos é um desafio importante, tendo em vista que o seu principal componente ativo, a carboximetilcelulose, tem maior solubilidade e proporciona uma forte influência inicial, mas se dissolve rapidamente e perde a sua eficácia num período de tempo relativamente curto, dissolvendo progressivamente durante seu uso (ADISMAN, 1989; GRASSO, 2004). O pequeno período de retenção oferecido pelos adesivos protéticos pode ser a razão pela qual alguns usuários de prótese total necessitam reaplicá-los 2 ou 3 vezes ao dia, a fim de manter sua função primordial (HAN, 2014).

A diferença no potencial de adesão pode ser atribuída aos diferentes graus de solubilidade dos componentes do adesivo (UYSAL et al., 1998). Segundo alguns fabricantes, incluindo COREGA®, a duração do potencial de adesão dos adesivos protéticos pode chegar até 12 horas. Porém Chew (1990) propôs, inicialmente, que os adesivos, na forma de creme ou de pó, perdem cerca de 30 a 50% da eficácia do potencial de adesão após 3 horas de uso. Em concordância com os achados iniciais, Kulak, Ozcan e Arikan (2005) e Koronis et al. (2012) afirmaram que a eficácia do potencial de adesão do adesivo protético, em contato com ambiente aquoso, como a mucosa bucal, é de, no máximo, 4 horas, não suportando mais do que 10 horas.

Por fim, existe certo receio para a prescrição dos adesivos aos usuários de próteses totais, pelos cirurgiões-dentistas, por considerarem um atestado de falha no tratamento envolvendo o edêntulo total. Porém, o uso apropriado e devidamente indicado dos adesivos pode melhorar a função e a retenção da prótese, além de fornecer a sensação de segurança e conforto físico e psicológico do paciente, diminuindo as forças musculares excessivas da mastigação que acabam movimentando a prótese, impedindo o trauma tecidual e consequentemente o risco de desenvolver a EP.

2.5 Adesivos protéticos e a EP

A relação entre as alterações da mucosa bucal e a utilização dos adesivos surgiu anteriormente como uma preocupação profissional. Estudos mostraram, na verdade, que o uso do adesivo protético não está associado a lesões dos tecidos moles subjacentes. A preocupação era em relação ao crescimento de microrganismos, quando pesquisas informaram que os adesivos não inibiam a presença dos mesmos (BARTELS, 1944; BARTELS, 1945).

Nesta mesma linha de raciocínio, em 1959, Kelly e colaboradores (1959) afirmaram que os adesivos inibiam o crescimento bacteriano. Quase 12 anos mais tarde, no entanto, pesquisadores verificaram que adesivos suportam algum crescimento microbiano como o de *C. albicans* e *Streptococcus mitis* (STAFFORD; RUSSELL, 1971).

O efeito que o adesivo protético pode ter sobre a microbiota oral, particularmente sobre *Candida*, é especialmente importante em usuários de próteses totais que sofrem de EP. As interações entre os adesivos e microbiota bucal foram examinados, mas os resultados permaneceram inconsistentes e até mesmo controversos. Um estudo in vitro mostrou que alguns adesivos para próteses dentárias suportam o crescimento de *C. albicans*, induzindo a formação de hifas (STAFFORD; RUSSELL, 1971). Outros sugeriram que os adesivos possuíam atividade antifúngica (MAKIHARA et al., 2001). Recentemente, dois estudos in vivo sugeriram que os adesivos protéticos não alteraram a microbiota bucal no período experimental de 14 dias (KIM; DRISCOLL; MINAH, 2003; OLIVEIRA et al., 2010). Estas discrepâncias podem também ser atribuídas ao fato de cada estudo avaliou diferentes adesivos e empregaram diferentes técnicas para avaliar o crescimento microbiano.

Atualmente, partindo desta perspectiva, Sampaio-Maia et al. (2012) realizaram um estudo para avaliar o efeito de vários tipos de adesivos protéticos comercialmente disponíveis (Corega® creme, Kukident® creme, Novafix® creme, Polident® creme, Protefix® creme, Steradent® e Aderyn® pó, Corega® ultra-pó, Protefix® pó e Corega® tira) sobre o crescimento in vitro de *C. albicans*. Em paralelo, verificaram a contaminação microbiana de todos os adesivos estudados e observaram que os adesivos em pó apresentam carga microbiana menor que 100 UFC/g, sendo considerados isentos de contaminação. Sobre os efeitos dos adesivos

no desenvolvimento de *C. albicans*, o adesivo Corega® ultra-pó aumentou o pH do meio no qual o inóculo estava presente. Além disso, o adesivo Corega® creme ao longo dos períodos avaliados (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação) não demonstrou efeito inibitório quando comparado aos outros adesivos em creme. Quanto as características morfológicas analisadas macro e microscopicamente, no meio de cultura Saboraud contendo 1% de adesivo Corega® ultra-pó foi visualizado as menores colônias de *C. albicans*, ainda assim, ao redor das células fúngicas foi observado uma estrutura semelhante a uma cápsula; o adesivo pareceu interferir no aumento na vacuolização da célula fúngica leveduriforme. Por fim os autores concluem que os adesivos protéticos podem induzir alterações morfológicas macroscópicas e microscópicas em células fúngicas leveduriformes, entretanto deve-se levar em consideração a composição de cada adesivo em relação às diferenças encontradas na inibição do crescimento de *C. albicans*.

Tendo em vista estas controvérsias sobre a contaminação microbiana, devemos nos ater ao trauma tecidual, que pode ser evitado pelo uso dos adesivos. O trauma causado pela prótese é considerado um fator significativo na iniciação e na perpetuação da EP, e os adesivos protéticos podem ter uma influência positiva na inibição da inflamação, reduzindo potencialmente o trauma (STAFFORD; RUSSELL, 1971).

Em 1980, pesquisadores relataram uma investigação de seis meses sobre a incidência e a gravidade da irritação da mucosa em um grupo de 111 usuários de próteses totais que faziam uso regularmente de adesivos. Neste estudo não relataram o aumento da incidência de irritação da mucosa. Além disso, os investigadores descobriram que a irritação da mucosa adjacente em alguns pacientes no início do estudo foi melhorada ou eliminada quando o adesivo era utilizado. Os autores concluíram que a utilização de um adesivo apropriado pode reduzir a probabilidade de irritação do tecido da mucosa de suporte das próteses totais (TARBET; GROSSMAN, 1980).

Posteriormente a esse achado, na década de 90, Grasso et al. (1994) relataram uma melhora estatisticamente significativa em todas as dimensões do movimento maxilar dos pacientes, quando o adesivo protético foi utilizado. Isto sugere que o trauma do tecido pode diminuir com o uso dos adesivos protéticos, reduzindo, conseqüentemente, a predisposição de usuários de próteses totais a desenvolverem EP.

2.6 Tratamento da EP e suas limitações

Tendo em vista a contaminação por *Candida* spp., as colônias são mais frequentemente isoladas da superfície interna das PTR do que da mucosa subjacente (DAVENPORT, 1970; ARENDORF; WALKER, 1979; MAHONEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998; BANTING; HILL, 2001). Isto reforça a idéia de que o tratamento para EP deve ser direcionado às próteses (DAVENPORT, 1972; NEPPELENBROEK; PAVARINA; GIAMPAOLO, 2005). Sendo assim, o tratamento pode envolver o desgaste com reembasamento da superfície interna da prótese, a higiene eficiente da prótese, sua remoção durante a noite e o uso de substâncias químicas sintéticas, tais como clorexidina e hipoclorito de sódio. Associado a estes procedimentos, a aplicação de antifúngicos tópicos sobre a área afetada e sobre a prótese parece ser bem interessante, levando em conta o principal fator etiológico da EP. Antifúngicos tradicionais comumente utilizados para o tratamento da EP são os compostos imidazólicos (miconazol, fluconazol), compostos poliênicos (nistatina) e clorexidina (CASAROTO; LARA, 2010).

Biofilmes de *C. albicans* são altamente resistentes a uma variedade de agentes antifúngicos, como a nistatina, clorexidina e cetoconazol (CHANDRA et al., 2001b). A base desta resistência aos fármacos não se encontra totalmente esclarecida, mas, em alguns casos, pode ser devido a presença de um pequeno número de células tolerantes e pela presença de uma matriz exopolissacarídica rica em glucano nos biofilmes (NETT et al, 2011; RAWYA; AL-DHAHERI; DOUGLAS, 2010). Ainda, o material extracelular liberado pelo fungo é conhecido por interagir fisicamente com antibióticos e contribui para a resistência contra fármacos (GILBERT; DAS; FOLEY, 1997; NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998). Sendo assim, a resistência do biofilme de *Candida* para os fármacos antifúngicos pode ser influenciada pela: maturação devido a alterações na composição da matriz, (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; AL-FATANNI; DOUGLAS, 2006), alteração da atividade metabólica (CHANDRA et al., 2001a; PARAHITEYAWA et al., 2006) e pela taxa de difusão do fármaco (AL-FATANNI; DOUGLAS, 2004) que depende do tempo de desenvolvimento do biofilme, da produção de moléculas de quorum sensing e das alterações na parede celular do fungo (TOBUDIC et al., 2009). Portanto, a eliminação da fase inicial da colonização de biofilmes microbianos, a qual envolve a

deposição de película condicionante proporcionada, por exemplo, pela saliva e pela adesão microbiana, torna-se crucial para minimizar infecções microbianas (HABASH; REID, 1999).

Os antifúngicos da classe dos polienos, como a nistatina, possuem um amplo espectro de ação, podendo ser fungicidas e fungistáticos. Por serem tóxicos, seu uso foi restringido para administração tópica (ROGERS, 2002). Entretanto, tem sido relatado que os fármacos locais, dificilmente mantêm-se na cavidade bucal em uma concentração letal para os patógenos, devido à condição dinâmica deste ambiente (CARTER; KERR; SHEAPHEARD, 1986; ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 1998). A ação de limpeza, os movimentos da língua e a deglutição apresentam efeitos diluentes que rapidamente eliminam os antimicrobianos locais da cavidade bucal (BANTING; GREENHORN; MCMINN, 1995; BANTING; HILL, 2001)

O efeito inibitório da nistatina é resultado da interação de seus polienos com os esteróides da membrana plasmática do fungo, em particular o ergosterol. Isto leva a formação de poros ou canais na membrana, que ocasionam a liberação de potássio e outros componentes intracelulares, causando a morte celular. Uma possível explicação para o desenvolvimento da resistência microbiana frente aos polienos é uma diminuição da síntese de ergosterol na membrana celular; mas os mecanismos genéticos envolvidos neste processo ainda não estão totalmente esclarecidos (ROGERS, 2002)

Antifúngicos tópicos, como a nistatina e seus derivados, são eficazes inicialmente, porém a sua utilização pode produzir efeitos colaterais e quando a terapia é interrompida, mediante a dificuldade para a aplicação diária destes antifúngicos, em especial nistatina, a doença pode reaparecer (CHANDRA et al, 2001b). A ingestão negligenciável de medicamentos antifúngicos, utilizados para uma possível resolução ou diminuição do quadro infeccioso, aumenta a resistência de biofilmes de *C. albicans* aos antifúngicos convencionais, tornando um problema significativo no desenvolvimento das infecções (MARTINS et al., 2004). As medicações antifúngicas devem ser empregadas de maneira controlada, por períodos de 15 a 30 dias, nos casos mais severos ou em pacientes imunocomprometidos, e apenas se as outras medidas preventivas não tiverem resolvido a doença, para que não haja uma infecção recorrente por cepas mais resistentes (ANDRADE-CETTO; HEINRICH, 2005).

Na aplicação tópica para o tratamento da EP, a nistatina, em particular, apesar de sua eficácia, possui um gosto amargo e pode causar reações alérgicas, insuficiência adrenal, necrose e interações medicamentosas hepáticas (PATTON; BONITO; SHUGARS, 2001; HOWLAND et al., 2005; SCALERCIO et al., 2007; TOMMY; HAMES, 2007; LITTLE; FALACE, 2008). Além disso, muitas vezes nistatina não é capaz de eliminar os microorganismos presentes nas bases das próteses, possibilitando um ciclo de reinfecção, que pode ocorrer em até duas semanas após o tratamento (BERGENDAL; ISACSSON, 1980). Dessa forma, é fundamental a adoção de métodos que atuem de forma eficiente nos patógenos colonizadores dessa superfície (DAVENPORT, 1970; OLSEN, 1975; NEPPELENBROEK et al., 2008).

Uma vez que os métodos mencionados não são absolutamente eficazes, pois não removem completamente o agente etiológico da mucosa palatina e das próteses, a recorrência da doença é frequente. Todos os fatores etiológicos envolvidos direta ou indiretamente no ciclo da EP devem ser levados em consideração (MAVER-BISCANIN et al., 2005). A higienização da prótese é responsabilidade do paciente, mas a orientação e motivação são obrigações do profissional. O primeiro passo é a conscientização dos usuários de PTR sobre o possível reservatório de microorganismos patogênicos, agentes etiológicos da EP, presente na prótese (NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998).

Apesar de um importante grau de eficácia apresentado pelos antifúngicos no tratamento da EP, a infecção é, na maioria das vezes, restabelecida logo após o tratamento, seja por interrupção do tratamento por conta dos efeitos colaterais como pela resistência dos fungos *Candida* spp., já que os microorganismos aderidos à prótese não são eliminados pelos tratamentos convencionais. Estas observações reforçam as limitações da terapêutica antifúngica atual. Sendo assim, torna-se fundamental e indispensável o desenvolvimento e adoção de novas terapias para o tratamento/prevenção da EP que minimizem ou, preferencialmente, eliminem os microorganismos das superfícies das próteses, sobretudo as espécies *Candida*, e que sejam menos deletérios que os antifúngicos convencionais, em relação aos efeitos colaterais comumente relatados.

A utilização de fitoterápicos, para o combate a microorganismos do biofilme da placa dentobacteriana ou à candidose bucal, vem comprovando a eficácia desses agentes como antimicrobianos e antiaderentes (ALVES et al., 2009). Como vários

extratos de plantas têm demonstrado ação antifúngica sobre *C. albicans*, possivelmente tais plantas desempenhem papel importante no tratamento da EP (CASAROTO; LARA, 2010).

2.7 A utilização de fitoterápicos: *Equisetum giganteum* e *Punica granatum*

Na última década, a utilização de plantas medicinais aumentou substancialmente, uma vez que as mesmas vêm demonstrando ser fonte eminente de novos agentes terapêuticos (HARVEY, 2000; CARVALHO; FERREIRA, 2001; KAYSER; KIDERLEN; BRUN 2001). Isto pode ser explicado pela sua capacidade de sintetizar e produzir compostos bioativos, a partir do seu metabolismo secundário que, na maioria das vezes, é de difícil obtenção através da síntese química. Entretanto, apenas 10% da biodiversidade foram submetidos à avaliação da atividade biológica, o que significa que muitos compostos estão à espera de identificação (HARVEY; WARTERMAN, 1998; HARVEY, 2000).

A tendência universal para a medicina alternativa tem sido bastante elevada (ZHOU et al., 2016). A fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas. As matérias primas dos fitoterápicos são órgãos de plantas medicinais (folhas, caules, frutos, flores e raízes) com efeitos farmacológicos medicinais, alimentícios, coadjuvantes técnicos ou cosméticos (ROSA, 2002). Atualmente, a fitoterapia é considerada uma ciência consolidada, já que são necessários os conhecimentos de fisiologia, fisiopatologia e outras áreas da saúde para lidar com a possibilidade de cura e prevenção oferecida pelas plantas medicinais, bem como com os efeitos colaterais que elas podem resultar se utilizadas de maneira inadequada (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002).

A fitoterapia trata-se de um recurso de prevenção, auxílio e controle no tratamento de patologias, por meio da atividade antimicrobiana que algumas plantas apresentam. É a forma mais antiga e fundamental de cura. A cada dia as plantas ganham espaço como aliadas na manutenção da homeostase. Podem possuir propriedades que auxiliam na cura de diversas patologias, de forma integral e não agressiva, pois estimula as defesas naturais do organismo (ROSA, 2002).

Os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados como bactericidas, viricidas, fungicidas, antiparasitários, inseticidas, bem como em medicamentos e

aplicações cosméticas, especialmente nas indústrias farmacêuticas como descrito em revisão de literatura (BAKKALI et al., 2008). Alguns destes óleos constituem alternativas eficazes com efeitos secundários reduzidos, os quais podem ser utilizados como agentes isolados ou em conjunto com outros tipos de materiais (CARSON; RILEY, 2003), como por exemplo, os adesivos protéticos. Extratos de algumas famílias botânicas têm sido reconhecidos por meio da atividade biológica contra diferentes microrganismos (ELLSE; WALI, 2014).

Muitos medicamentos à base de plantas foram consumidos por centenas de anos. O alho foi relatado como sendo o mais comumente usado como planta medicinal (ARGAWAL, 1996; GARDINER et al., 2007). É visto como um dos mais importantes fitoterápicos com ampla propriedade antimicrobiana e, ao mesmo tempo, atua positivamente sobre o sistema imune (PHARAND et al., 2003). Os resultados de um estudo, sobre a comparação do efeito terapêutico do extrato aquoso de alho e bochechos de nistatina em EP, revelaram que ambos os tratamentos têm efeito benéfico na EP. Pacientes com EP submetidos a bochechos com nistatina demonstraram recuperação mais rápida das lesões, embora com mais efeitos colaterais e menos satisfação, mencionados pelos pacientes, em comparação com o extrato de alho. O gosto amargo e a preparação repetida de nistatina poderiam justificar a menor aceitação deste medicamento pelos pacientes (BAKHSHI et al., 2012).

Considerando a falta de efeitos colaterais e também uma eficácia adequada para melhorar as lesões eritematosas causadas pela EP, com uma taxa de satisfação de 85% pelo pacientes, o extrato de alho poderia ser considerado como uma substituição adequada para a nistatina no tratamento de EP (BAKHSHI et al., 2012). No entanto, a avaliação da eficácia de plantas medicinais em comparação com as drogas químicas atuais exige a realização de ensaios clínicos precisos, pois medicamentos à base de plantas necessitam de condições especiais, como concentrações e modo de aplicação, para serem funcionalmente eficazes (ERNST, 2006).

Catalán et al. (2008) mostraram in vitro que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* associado com Coe - Comfort ou Fitt (condicionadores de tecido) possui tanto atividade inibitória como fungicida sobre *C. albicans*, sendo eficaz no tratamento da EP. Isto reforça positivamente a ideia de associação dos fitoterápicos com outro material utilizado na prática clínica odontológica: o adesivo protético.

Nesse contexto, a atividade antimicrobiana de *P. granatum* L., conhecida como Romã, tem sido amplamente investigada (NAQVI; KHAN; VOHORA, 1991; ENDO et al., 2012; BAKKIYARAJ et al., 2013; LABSI et al., 2016). *P. granatum* é uma planta da família Punicaceae, cultivada mundialmente em regiões de clima tropical e subtropical (PEREIRA, 2006). Esta planta apresenta um arbusto lenhoso e ramificado, sendo nativa da região que abrange desde o Irã até o Himalaia, a noroeste da Índia. Os preparos obtidos da romãzeira (flor, fruto e casca do fruto) são popularmente usados para tratar vários problemas de saúde (LANGLEY, 2000). O extrato de *P. granatum* é rico em dois tipos de compostos polifenólicos: as antocianinas, que dão a cor vermelha às frutas e ao suco, e os taninos hidrolisáveis, amplamente relacionados à atividade antimicrobiana desta planta (JURENKA, 2008).

Avaliando a atividade antifúngica e as modificações morfológicas/estruturais das células de *Candida* spp. causadas pelo extrato etanólico de *P. granatum*, pesquisadores observaram que o extrato obtido através do pericarpo e da casca deste fruto apresentou melhor atividade antifúngica, provavelmente ocasionada pela presença de alta concentração de compostos, como: punicalagina, pedunculagina, telimagrandina e galagildilacton. Tais pesquisadores verificaram, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), que o extrato da casca de *P. granatum* interferiu sobre a estrutura da levedura de *C. albicans*, com alterações na parede celular, tornando-se mais espessa e deformada, e sobre a espessura do septo entre a célula-mãe e as células-filhas, influenciando no crescimento do biofilme previamente formado. Este estudo permitiu concluir que o extrato do pericarpo e da casca de *P. granatum* causa danos graves para a estrutura celular das leveduras de *C. albicans* (ANIBAL et al., 2013).

Esses dados corroboram outras pesquisas com *P. granatum*. Catão et al. (2006) e Fetrow e Ávila (2000) indicaram que taninos, tais como punicalina, punicalagina, galagildilactona, pedunculagina, telimagrandina I e corilagina, são responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada em *P. granatum*. Anibal et al. (2013) observaram uma elevada atividade do composto isolado de punicalagina contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*, indicando esta substância como um potente agente antifúngico. Vasconcelos et al. (2003) atribuíram, aos taninos, a capacidade de inibir o crescimento da levedura de *Candida* spp., devido a sua interferência especificamente na membrana celular, precipitando proteínas.

O mecanismo específico de ação de taninos contra *Candida* spp. não está claramente elucidado. Scalbert (1991) propôs alguns mecanismos distintos para explicar a atividade antimicrobiana dos taninos. Estas incluem: (i) inibição das enzimas microbianas extracelulares; (ii) a privação de substratos e íons de metais necessários para o crescimento microbiano e (iii) a ação direta sobre o metabolismo microbiano através da inibição da fosforilação oxidativa. Além disso, segundo Haslam (1996), os taninos são capazes de complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas, como proteínas e polissacáridos.

Neste mesmo contexto, a partir de um estudo avaliando a atividade antifúngica do extrato e dos compostos isolados a partir das cascas de *P. granatum* contra *C. albicans*, pesquisadores identificaram e verificaram na fração acetato de etila, que a atividade antifúngica de *P. granatum* é predominantemente devido à presença da punicalagina, principal composto presente no extrato das cascas da Romã (ENDO, et al., 2010).

Pesquisadores observaram in vitro que as bactérias orais e o fungo *C. albicans* são sensíveis ao extrato de *P. granatum* e afirmaram a importância das indicações terapêuticas das plantas medicinais como método alternativo na clínica odontológica, uma vez que o extrato hidroalcoólico da casca de *P. granatum* apresentou potente atividade antimicrobiana sobre os microrganismos presentes no biofilme supra-gengival, como também demonstrou, in vitro, inibição da aderência microbiana na superfície (QUEIROZ, 1998; PEREIRA, 2006).

O extrato de *P. granatum* parece estar envolvido com a inibição da adesão microbiana. Pesquisadores afirmam que bactérias orais e *C. albicans* são sensíveis a esse extrato. Tendo em vista as lacunas com relação ao conhecimento do mecanismo de ação dos princípios bioativos desta planta sobre os microrganismos, acredita-se que os taninos, principais polifenóis do extrato de *P. granatum*, atuem no metabolismo celular, através das paredes celulares. Estes compostos se ligam à parede celular, atravessam essa estrutura e interferem na produção de proteínas e enzimas responsáveis pela adesão microbiana. (VASCONCELOS et al., 2006). Além disso, os taninos atuam perturbando a co-agregação entre os microrganismos na parede celular (VASCONCELOS et al., 2003). Corroborando a pesquisa anterior, pesquisadores relataram que a atividade antimicrobiana está relacionada diretamente com a alta quantidade de taninos presentes nos extratos (DJIPA; DELMEE; QUETIN-LECLERCQ, 2000).

Em relação à associação deste extrato com outro tipo de material, verificou-se que o extrato de *P. granatum* atua como um agente antifúngico contra *Candida* spp. quando associado a um gel. Assim, foi possível concluir que o extrato de *P. granatum* pode ser utilizado como um agente antifúngico tópico eficaz no tratamento da EP, quando associado a outro tipo de material de aplicação tópica (VASCONCELOS et al., 2003).

Sob a mesma perspectiva e hipótese, pesquisadores propuseram-se a avaliar o efeito antimicrobiano do gel de *P. granatum* e do miconazol (Daktarin® gel oral) na adesão ao vidro de 3 cepas padrão de *Streptococcus* (*mutans*, *sanguis*, e *mitis*), de isolados clínicos de *S. mutans* e de *C. albicans*, com e sem associações. Nos experimentos com 3 ou 4 microrganismos associados, o gel de *P. granatum* apresentou maior eficiência em inibir a adesão microbiana do que o miconazol. Os resultados deste estudo sugerem que o fitoterápico testado pode ser usado no controle da adesão de diferentes microrganismos na cavidade bucal, tendo em vista os efeitos colaterais comumente associados à utilização destes fármacos convencionais (VASCONCELOS et al., 2006).

Com o princípio de avaliar o efeito antibacteriano do extrato de *P. granatum* sobre o crescimento de *Streptococcus aureus* e sobre a subsequente produção de enterotoxinas, pesquisadores determinaram a susceptibilidade bacteriana pelo método de tubo-diluição, e a produção de enterotoxinas foi avaliada usando placas de membrana sobre ágar. Em concentrações baixas (0,01% v/v), o extrato inibiu o crescimento bacteriano, enquanto que em uma concentração mais elevada (1% v/v), este extrato eliminou o crescimento bacteriano. Além disso, foi observado que, na concentração de 0,05% (v/v), o extrato de *P. granatum* inibiu a produção de enterotoxina estafilocócica A. Com base nos resultados, os autores puderam afirmar que estes extratos podem ser utilizados como potenciais agentes terapêuticos antibacterianos, com a capacidade adicional de inibir a produção de enterotoxinas (BRAGA et al., 2005).

Com o mesmo intuito, a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* foi avaliada por pesquisadores pelo método de difusão em ágar em 38 cepas de *S. aureus*, sendo 22 resistentes à penicilina, isoladas de vacas aparentemente saudáveis, nos municípios da região semi-árida do Estado da Paraíba, Brasil, para determinar a CIM. O extrato de *P. granatum* apresentou ação antimicrobiana sobre todas as cepas testadas, formando zonas de inibição variando

de 10 a 36 mm de diâmetro. Os resultados deste estudo confirmaram a eficácia do extrato de *P. granatum* como agente antibacteriano sobre *S. aureus* (DA SILVA et al., 2008).

Atualmente, a literatura científica aponta que *P. granatum* também tem potencial anti-inflamatório. Neste contexto, um dos primeiros trabalhos exibindo os benefícios dos compostos fenólicos da romã foi descrito por Schubert, Lanski e Neeman, (SCHUBERT; LANSKY; NEEMAN, 1999). O trabalho mostrou que os flavonóides extraídos do suco fermentado e do óleo das sementes deste fitoterápico provocaram inibição da atividade das enzimas oxidantes ciclooxigenase e lipoxigenases, importantes no desenvolvimento do processo inflamatório. Seguidamente, trabalhos demonstraram a contribuição benéfica do suco da romã na atenuação de fatores aterogênicos (AVIRAM et al., 2000; AVIRAM; DORNFELD, 2001). O extrato feito com o pó da casca da fruta também atuou na modulação das respostas anti-inflamatórias (GRACIOUS-ROSS; SELVASUBRAMANIAN; JAYASUNDAR, 2001).

Popularmente conhecida como “cola de caballo”, “limpia plata” e “yelba del platero”, *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae, subgênero *Equisetum*) é uma pteridófita criptógama vascular, da família das samambaias e avencas, sendo bem conhecida no ramo da Medicina (KLOUCEK et al., 2005). É uma espécie rizomatosa, herbácea, perene, de 1 a 2 metros de altura, possui caules fistulosos, espessos e ramificados e folhas negras escamiformes dispostas em forma de bainha (RICCO et al., 2011)

Considera-se uma das formas de vida vegetal mais antiga em comparação com as outras espécies da flora universal. Vários trabalhos demonstram suas propriedades farmacológicas como diurética (GRAEFE; VEIT, 1999), antioxidante (TROUILLAS et al., 2003), vaso-relaxante (SAKURAI et al., 2003) e anti-inflamatória (MARTINS et al., 2004). Resultados positivos sob células ósseas indicam possível utilização de extratos de *E. arvense* em pesquisas com próteses ósseas (FERRAZ et al., 2008).

Trabalhos iniciais (SOMME, 1961; SOMME; MINTEZER; RINDASU, 1962) mostraram que seu óleo essencial exibiu uma atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *S. pyogenes* e algumas micobactérias. O fenólico monoterpeneo timol tem sido considerado o componente antimicrobiano do óleo de *E. arvense* (PATTNAIKE et al., 1997; TEPE et al., 2004), demonstrando potencial atividade antifúngica in vitro

contra *C. albicans*, diminuindo infecções causadas por este agente patogênico, como a EP (RADULOVIC et al., 2006).

Em contrapartida, pouco se sabe sobre os mecanismos da espécie *giganteum*. *E. giganteum* ocorre das Grandes Antilhas à América Central, Chile, Argentina e Brasil (KIMBER; DERMAN, 2002a). Como indicado em seu nome, uma de suas características marcantes é o seu tamanho. É amplamente empregado em substituição para *E. arvense*. Porém, *E. giganteum* é uma espécie pouco estudada em relação ao seu perfil químico e não possui a mesma diversidade de trabalhos descritos como *E. arvense*. No Brasil, ocorre no Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal), Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), sendo ainda encontrada no Cerrado de Bauru (ARANTES et al., 2010).

Entretanto, os benefícios de *E. giganteum* contra a formação de biofilme de *C. albicans* já foram previamente observados pela nossa equipe. Este fitoterápico possui as seguintes propriedades: ação antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. aureus* e *Escherichia coli*; ação antiaderente em *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável; e ação anti-inflamatória sobre monócitos humanos ativados por *C. albicans*. Além disso, o fitoterápico não comprometeu a viabilidade de monócitos humanos ou de células epiteliais de palato humano, demonstrando não apresentar toxicidade. Simultaneamente a estes achados prévios, o extrato bruto de *E. giganteum* revelou a presença de compostos fenólicos derivados do ácido cafeico e ácido ferúlico, e de heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina do kaempferol, além de estilipironas (ALAVARCE et al., 2015).

Considerando estudos toxicológicos, os mecanismos de toxicidade do fitoterápico *E. arvense* e suas propriedades inseticidas e fungicidas ainda não foram aceitos por unanimidade entre os pesquisadores, principalmente por não se conhecer a dose efetiva e a dose tóxica. A intoxicação aguda por tiaminase, principal composto tóxico do *E. palustre*, é comprovada no gado equino (RIETI-CORRÊA; RIETI-CORRÊA G; SCHILD, 2002); mas há poucas pesquisas sobre essa intoxicação em outros animais e em humanos. O tratamento com doses crescentes de *E. arvense* não induz hepatotoxicidade aguda em ratos (BARACHO et al., 2009); sendo assim acredita-se que a fitoterapia seja uma alternativa terapêutica isenta de efeitos adversos e/ou incapaz de causar interações medicamentosas (ERNST;

ANGST, 1995), desde que levamos em consideração a espécie a ser estudada e as concentrações.

Kaempferol é um flavonoide amplamente distribuído no reino vegetal. Os flavonoides são conhecidos por desempenharem papel protetor contra a invasão microbiana em plantas que sintetizam esses polifenóis (HARBORN; WILLIAMS, 2000). Não é de se surpreender, portanto, que as plantas ricas em flavonoides tenham sido utilizadas durante muitos anos na medicina tradicional para o tratamento de doenças infecciosas (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Plantas comestíveis apresentam em grande escala este flavonoide, e estima-se que a ingestão humana deste polifenol pode ser de até cerca de 10 mg/dia (GATES et al., 2007). Estudos epidemiológicos têm encontrado uma associação positiva entre o consumo de alimentos contendo kaempferol e uma redução do risco de desenvolver doenças cardiovasculares e outros tipos de patologias. Seus glicosídeos têm sido isolados a partir de plantas utilizadas na medicina popular para testar suas propriedades antimicrobianas; sendo assim concluem que o kaempferol, seus glicosídeos, ou plantas que contenham kaempferol possuem ação antibacteriana, antiviral e antifúngica (DE VRIES et al., 1997; ADEBAMOWO et al., 2005).

Alguns estudos descobriram que kaempferol interfere sobre as enzimas vitais para o crescimento ou virulência de certos fungos (HWANG et al., 2001; OZCELIK et al., 2006; YORDANOV et al., 2008; BRUNSKOLE et al., 2009). A quitina é um polissacarídeo estrutural da parede das células dos fungos, o que é vital para a sua integridade e é sintetizada pela quitina-sintetase II. Pesquisadores realizaram um estudo in vitro com diversos tipos de flavonoides e descobriram que o kaempferol inibia a quitina-sintase II, impedindo assim a divisão celular fúngica (HWANG et al., 2001).

Também tem sido mostrado que o kaempferol é capaz de inibir a síntese de melanina (BRUNSKOLE et al., 2009); melanina é um fator de virulência em fungos patogênicos e um alvo conhecido por compostos antimicóticos. Este polifenol afeta enzimas extracelulares de *C. albicans*, que são requeridas como fatores de virulência responsáveis pela penetração da levedura em células hospedeiras. Além disso, sua administração em animais com infecção sistêmica causada por *C. albicans* resultou em um aumento sobre o número de animais sobreviventes (YORDANOV et al., 2008).

Uma única administração oral de extratos obtidos das partes aéreas de *Equisetum myriochaetum* reduziu os níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos, possivelmente o tipo de kaempferol encontrado na espécie de *Equisetum* foi responsável por essa atividade (ANDRADE et al., 2000). O efeito hipoglicemiante de um extrato aquoso das partes aéreas de *E. myriochaetum* foi posteriormente avaliado em onze pacientes diabéticos tipo II. Os autores descobriram que a administração oral deste extrato (0,33 g/kg) reduziu significativamente os níveis de glicose no sangue nesses pacientes sem afetar de forma significativa os níveis de insulina (REVILLA et al, 2002).

A partir de constatações referentes às consequências sobre a saúde humana, segundo alguns autores, o desequilíbrio do sistema imune pode facilitar o aparecimento de doenças auto-imunes e de reações de hipersensibilidade, e ainda aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções oportunistas. Levando este fator em consideração, faz-se relevante o estudo sobre a utilização de fitoterápicos, como *E. giganteum* e *P. granatum*, já que possuem flavonoides, como o kaempferol, e taninos hidrolisáveis, como punicalagina, em sua composição fitoquímica, respectivamente. Tais fitoterápicos podem representar uma alternativa viável e eficaz, visto seu potencial antimicrobiano indispensável para o auxílio no tratamento de doenças infecciosas, como por exemplo, a EP (LUSTER; ROSENTHAL, 1993; DESCOTES et al., 2000; KIMBER; DEARMAN, 2002b, GALLOWAY; HANDY, 2003).

Em resumo, os extratos de *E. giganteum* e *P. granatum* apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória. Relatos na literatura demonstram ainda que fitoterápicos são eficazes contra patógenos bucais, como *C. albicans* (KOO et al., 2000b; SAMET et al., 2007; PAIVA et al., 2008), e em comparação com os antifúngicos convencionais, não apresentam efeitos colaterais como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (no caso dos antifúngicos sistêmicos) ou mau gosto e dores epigástricas (no caso dos antifúngicos locais).

A medida que os fabricantes tentam melhorar seus produtos, a composição dos adesivos protéticos pode mudar; entretanto, mais pesquisas são recomendadas para avaliar a manutenção clínica dos adesivos, o tempo de retenção na mucosa subjacente a prótese e a possível contaminação microbiana. Podendo estar associados a componentes não ativos, como agentes antimicrobianos, torna-se fundamental e de grande importância clínica a associação do adesivo protético a

fitoterápicos, uma vez que estes possuem propriedades antimicrobianas e são menos deletérios que os fármacos convencionais. Por fim, esta associação pode amplificar as funcionalidades dos adesivos protéticos, podendo tornar-se um método útil e eficaz para auxiliar no tratamento e/ou prevenção da EP, desde que não haja alterações de suas propriedades químicas ou físicas.

3 *Proposição*

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste trabalho foi avaliar se os fitoterápicos *E. giganteum* e *P. granatum*, associados a adesivo protético em pó COREGA®, influenciarão no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* aderido sobre a superfície da resina acrílica termopolimerizável.

3.1. Objetivos Específicos

- Realizar o estudo fitoquímico de substâncias potencialmente ativas de *E. giganteum* e *P. granatum*;
- Quantificar o biofilme de *C. albicans* induzido por 3, 6 e 12 horas sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, previamente tratada ou não com a associação adesivo/fitoterápico (*E. giganteum* ou *P. granatum*), por meio das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL);
- Avaliar o percentual de redução do biofilme de *C. albicans* induzido por 3, 6 e 12 horas, por meio da atividade metabólica das células viáveis, sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, previamente tratada ou não com a associação adesivo/fitoterápico (*E. giganteum* ou *P. granatum*), por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos

Os frutos de *P. granatum* foram obtidos no Supermercado Super Bom Premium (Av. Orlando Ranieri, 6-20 - Jardim Marambá Cep: 17030-671 Bauru/SP Fone: (14) 3201-3201), pelo Distribuidor de Frutas e Mudas Boa Fruta (Rua Padre Anchieta, 186 - Atrás da Banca Cep: 56300-000 Petrolina/PE Fone (87) 3861-4615).

De acordo com o produtor/agrônomo Paulo Sérgio de Carlos Nogueira, responsável por este cultivar, os frutos utilizados em nosso trabalho apresentam-se com coloração suavemente avermelhada, possuem sementes comestíveis e flores com sépalas curtas. A seleção dos genes se faz por meio da clonagem (propagação vegetativa) de quatro mudas a partir da planta matriz por estaquia, utilizando as sementes viáveis para a produção em escala. O cultivo é feito em Petrolina, PE, Brasil (Paralelo 9°46' S/Longitude 24°21' W), a poda é realizada bimestralmente por escalonamento e a irrigação é fornecida para o lote por gotejamento. Quando os frutos alcançam tamanho razoável para serem comercializados, é realizada a colheita, os frutos viáveis são separados em lotes, lavados, embalados e armazenados em caixas devidamente lacradas para posterior transporte e distribuição em seus respectivos destinos.

O material foi processado e analisado fitoquimicamente no Laboratório de Química de Produtos Naturais – UNESP/BAURU, sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Anne Lígia Dokkedal. Foram obtidos 2 Kg de material fresco para triagem das cascas do fruto (920g), as quais foram submetidas à secagem completa em estufa de circulação de ar (MA035/1 - Estufa de Secagem com Renovação/Circulação de Ar, Marconi®, Piracicaba, SP, Brazil) a 45°C.

Em seguida, as cascas foram pulverizadas em moinho de facas (MA048 - Moinho Micro de Facas, Marconi®, Piracicaba, SP, Brazil), a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos, sendo posteriormente pesadas, embaladas, etiquetadas e armazenadas em local seco e escuro. O extrato bruto (**EtOH 70%**) hidroalcoólico das cascas dos frutos de *P. granatum* foi obtido através de extração por percolação, um processo dinâmico, onde se faz o arrastamento dos compostos presentes na planta em pequenas quantidades ou pouco solúveis, pela passagem

continua do líquido extrator, levando ao esgotamento através do gotejamento do material (PRISTA, 1995).

O material seco e triturado (400g) foi previamente intumescido com 2L de EtOH:H₂O 7:3 durante 2 horas em béquer. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu à proporção 5:1 (referente ao volume do percolador e do material vegetal) em relação ao tamanho do percolador.

A vazão do percolador ficou entre 1-2,0 mL.min⁻¹Kg de material vegetal. Após extração exaustiva, a solução foi concentrada em rotaevaporador (Modelo Banho Maria Heizbad-VAP, Heidolph®, Schwabach, Germany) sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50°C, para a remoção do solvente orgânico. Após a remoção do solvente, o extrato bruto (**EtOH 70%**), proveniente das cascas dos frutos de *P. granatum*, foi liofilizado até a sua forma pó, obtendo 52g (13%).

A coleta de *E. giganteum* foi realizada em Novembro de 2014 no Jardim Botânico Municipal de Bauru, localizado às margens da rodovia Comandante João Ribeiro de Barros - SP 225 (22°20'30" S e 49°00'30" W). Dois ramos férteis da planta foram utilizados para a confecção de exsicatas (identificação e herborização) e incluídos no acervo do Herbário da UNESP de Bauru (UNBA 5795).

Foram obtidos 8 kg de material fresco (partes aéreas), os quais foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar, a 45°C, até secagem completa. Em seguida, o material seco (2,9 Kg) foi pulverizado em moinho de facas. A extração foi feita por percolação do pó (500g) obtido das partes aéreas da planta com etanol 70% (EtOH:H₂O 7:3).

Em seguida, foi realizada a obtenção do extrato bruto (**EtOH 70%**) hidroalcoólico das partes aéreas de *E. giganteum*, como descrito anteriormente, por meio da percolação obtendo 41g (8,3%).

4.2 Obtenção das frações de *E. giganteum* e *P. granatum* por Extração Líquido-Líquido (ELL)

A Extração Líquido-Líquido (ELL), conhecida como extração por solvente ou partição, é um método utilizado para separar componentes específicos de uma mistura de líquidos baseado em suas diferentes solubilidades (polaridades) em dois líquidos distintos e imiscíveis, geralmente água e um solvente orgânico adequado, visando fracionar os principais metabólitos secundários produzidos pelas plantas, sendo assim o soluto mais polar dissolve, preferencialmente, no solvente mais polar.

A partir da obtenção dos extratos brutos (**EtOH 70%**) de *E. giganteum* (partes aéreas) e de *P. granatum* (cascas), os materiais vegetais foram submetidos à ELL com diferentes solventes orgânicos contra fase aquosa. Para isso, uma alíquota de 2 g do extrato bruto (**EtOH 70%**) de ambas as plantas (*E. giganteum* e *P. granatum*) foi dissolvida, em 500 mL de água deionizada com o auxílio de um ultrasson (Ultrasonic Cleaner 1440D, Odontobrás®, Ribeirão Preto, SP, Brazil); o extrato então foi despejado em funil de separação (MOD94294 - Funil de Separação Squibb Torneira de Vidro e Rolha de Polipropileno, Laborglas®, Belenzinho, SP, Brazil). Posteriormente, 500 mL do solvente orgânico foram adicionados. Após agitação manual, o funil foi deixado “overnight” para a separação completa dos componentes que possuísem afinidade pelo determinado solvente. Este procedimento foi repetido duas vezes para cada passagem de solvente.

Para *P. granatum*, foram utilizados os seguintes solventes orgânicos: acetato de etila (**AcOEt**) e *n*-butanol (***n*-BuOH**) na proporção 1:1 (ENDO et al., 2010), e para *E. giganteum* foram utilizados: diclorometano (**CH₂Cl₂**), acetato de etila (**AcOEt**) e *n*-butanol (***n*-BuOH**) (ALAVARCE, 2015), também na mesma proporção. Como utilizamos as cascas dos frutos, não houve a necessidade da utilização de um solvente orgânico clorado para *P. granatum*.

Após o período de 48 horas, foi possível observar a separação completa da fase aquosa (**H₂O**) dos demais solventes orgânicos utilizados; então as frações de cada planta eram esgotadas, suavemente, para um béquer e concentradas em rotaevaporador (Modelo Banho Maria Heizbad-VAP, Heidolph®, Schwabach, Germany) para a retirada completa do solvente. Sendo assim, a fração purificada foi liofilizada até a sua forma pó, facilitando assim o manuseio nos demais protocolos.

Os esquemas 1 e 2 exemplificam as etapas realizadas para a obtenção do extrato bruto de *E. giganteum* e *P. granatum* por percolação e suas frações por ELL.

Fonte: SALDANHA L L. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu; 2013.

Esquema 1. Procedimentos envolvidos na obtenção do extrato bruto (EtOH 70%) e frações (CH₂Cl₂, AcOEt e n-BuOH) por ELL de *E. giganteum*.

Fonte: SALDANHA L L. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu; 2013.

Esquema 2. Procedimentos envolvidos na obtenção do extrato bruto (EtOH 70%) e frações (AcOEt e n-BuOH) por ELL de *P. granatum*.

4.3 Identificação dos Compostos por HPLC – PAD

A triagem cromatográfica por HPLC – PAD (High Performance Liquid Chromatography – Photodiode Array Detector - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos) foi realizada no Laboratório de Eletro Analítica da UNESP/Bauru coordenando pelo Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes. Para tanto, uma alíquota de 10 mg do extrato bruto e das frações de *E. giganteum* e *P. granatum* foram solubilizadas em MeOH:H₂O (1:1, v/v) e filtradas em filtro de seringa com membrana de PTFE (Politetrafluoroetileno) com poros de 0,45 µm. As separações cromatográficas foram realizadas com uma coluna de sílica de fase reversa Phenomenex® (C18) (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm). Como fase móvel, utilizam-se os solventes MeOH + Ác. Fórmico 0,1% (**A**) e H₂O + Ác. Fórmico 0,1% (**B**) e um gradiente exploratório de 5-100% de **A** em **B** em 60 minutos. Os cromatogramas foram monitorados em 254 nm e 360 nm (SALDANHA, 2013).

4.4 Escolha da fração e da concentração de *E. giganteum* e *P. granatum*

Após obtenção das diferentes frações por ELL, as mesmas foram submetidas à contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *C. albicans* SC5314 a fim de se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações. A CIM de cada fitoterápico foi a concentração selecionada para ser utilizada neste trabalho.

Para a caracterização da CIM, 10, 20, 30 e 50 mg de cada fração de ambos os fitoterápicos foram colocados em microtubos de 2 mL (Safe-lock – 2,0 mL, Eppendorf® do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil), com o auxílio de uma espátula, contendo 50 µL (5%) de DMSO (Dimetilsulfóxido - Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) e 950 µL de meio de cultura TSB (Trypticase Soy Broth - Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA).

Estas frações diluídas foram distribuídas em placas de 24 poços (TPP® - Techno Plastic Products, Trasadingen, SH, Switzerland) e homogeneizadas com 1 mL de *C. albicans* (a padronização do inóculo encontra-se no item 4.7), com o auxílio de pipetador (RESEARCH PLUS, Eppendorf® do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, Brazil). Como controle, o inóculo ficou mantido em 1 mL de TSB, meio de cultura

favorável ao desenvolvimento das células fúngicas. As placas foram mantidas em incubadora com agitação orbital (Shaker – Mod. 430/RDPB, Nova Ética®, Produtos e Equipamentos Científicos LTDA, Vargem Grande do Sul, SP, Brazil), a 37°C durante 24 horas.

Após 24 horas, 1 mL/poço foi coletado para se obter diluições seriadas em PBS, ou seja, 10^{-1} a 10^{-4} . A diluição ideal para a contabilização das UFC foi 10^{-4} . Então, alíquotas de 50 µL dessa diluição foram plaqueadas, em duplicata, em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco®, Detroit, Michigan, EUA) com cloranfenicol. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. As colônias viáveis do gênero *Candida* foram visualmente quantificadas, após três experimentos independentes.

As frações que apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* na menor concentração utilizada, ou seja, 10 mg, foram a diclorometano (**CH₂Cl₂**) para *E. giganteum* e o acetato de etila (**AcOEt**) para *P. granatum*.

As maiores concentrações de ambas as frações selecionadas (30 mg e 50 mg) apresentaram a melhor ação antifúngica em relação aos valores referentes ao número de colônias de *C. albicans* contabilizadas no grupo controle, alcançando uma diminuição de 56,63% e de 92,9%, respectivamente para **AcOEt** e 85,2% e 96%, respectivamente para **CH₂Cl₂**. Mesmo apresentando os menores valores, selecionamos a concentração de **30 mg para ambas as frações**, visto que, na concentração de 50 mg, as frações demonstraram ser citotóxicas para fibroblastos gengivais humanos (FGH) in vitro (dados não mostrados).

4.5 Confeção dos corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável

Os corpos de prova foram obtidos inicialmente a partir de padrões de silicone por condensação, de uso laboratorial (Zetalabor® - Zhermack, Badia. Polesine, Rovigo, Itália). Esses padrões foram confeccionados a partir de uma matriz de acrílico, de forma retangular, contendo 36 espaços quadrangulares medindo 10 mm de comprimento x 10 mm de largura x 5 mm de altura, a qual foi preenchida com silicone e prensada entre duas placas de vidro (JON® Com. de produtos odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brazil) previamente isoladas com vaselina sólida

(Hemafarma® Com. e Ind. Farmacêutica Ltda, São Gonçalo, RJ, Brazil), sob peso de 5 kg, por aproximadamente 10 minutos (**Figura 1A**).

Em seguida, os padrões de silicone foram removidos da matriz, os excessos foram cortados com auxílio de uma lâmina de bisturi, e os padrões sem defeito foram selecionados (JACOBINA, 2012). Os padrões foram incluídos em muflas de latão polido com pino nº 6 (Mac® Artigos odontológicos e prótese Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brazil), anteriormente isoladas com vaselina sólida. Em seguida, as muflas metálicas foram preenchidas com gesso pedra tipo III (Gesso Pedra Herodont®, Vigodent S/A. Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), manipulado e espatulado conforme orientações do fabricante, em cuba de borracha (Dentalbrand®, Comercial, São Paulo, SP, Brazil) com espátula para gesso (Indusbello® Ind. de Instr. Odontológicos, Londrina, PR, Brazil), sob vibração. O gesso então foi despejado na mufla até que houvesse quantidade suficiente para que os padrões de silicone pudessem ser submersos, assim iniciasse seu processo de presa (PINTO, 2007).

Esperado o tempo de presa do gesso, foi aplicado o isolante Cel-Lack® (S.S. White® Art. Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) em toda sua superfície. Assim como na mufla, a contra-mufla também recebeu uma camada de vaselina sólida nas suas superfícies internas e, posteriormente, foi posicionada e devidamente preenchida com gesso pedra tipo III, conforme condições técnicas descritas anteriormente. As muflas permaneceram na prensa hidráulica (Prensa Hidráulica Gold Line Essence Dental® VH Equipamentos Médicos Odont. Acess. Ltda, Araraquara, São Paulo, SP, Brazil) com 0,5 Kgf de pressão, por 1 hora, e em seguida, foram abertas para a remoção das matrizes de silicone e realização do exame do molde no gesso, a fim de verificar a presença de bolhas (PINTO, 2007) (**Figura 1B**).

Para prensagem e confecção dos espécimes, foi utilizada a resina acrílica termopolimerizável de cor rosa médio com veias Lucitone 550® (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil.), homogeneizada com auxílio de uma espátula nº 31 (SS White® Art. Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil) em recipiente de vidro (Paladon®, Pr. Ind. e Comércio de produtos odontológicos, Florianópolis, SC, Brazil), utilizando-se a proporção de 21 g de pó para 10 mL de líquido, conforme orientações do fabricante. O interior dos moldes de gesso foi isolado com isolante para resina acrílica com auxílio de um pincel de pêlo de marta (Condor® nº 456, Condor S.A.,

São Bento do Sul, SC, Brazil) e preenchido com a resina acrílica na fase plástica (**Figura 1C**).

A base da mufla foi fechada com a sua respectiva porção superior para ser prensada em prensa hidráulica sob pressão inicial de 0,5 kgf. No momento em que o ponteiro da prensa hidráulica se apresentou estável, a pressão foi aumentada lentamente para 1 kgf, a mufla foi aberta, e a película de resina acrílica excedente eliminada com o auxílio de uma espátula Lecron (S.S. White® Art. Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil). A mufla foi novamente fechada e levada para prensa hidráulica sob pressão de 1,250 kgf. Antes da polimerização, a resina foi deixada para “descansar” durante 30 minutos na mufla, seguindo orientações do fabricante (PINTO, 2007).

Decorrido esse período, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável (**Figura 1D**) (Metal Vander®, Aparelhos para Ortodontia, Piracicaba, São Paulo, SP, Brazil), passível de ser utilizada em polimerizadoras digitais, e levada à polimerizadora microprocessada digital em água modelo banho-maria, (Banho Maria SL 155/22, Solab® Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brazil), de acordo com o ciclo curto recomendado pelo fabricante (73°C durante 90 minutos; em seguida, 100°C, mantida por mais 30 minutos) (PAVARINA et al., 2005).

Após o período de polimerização dos corpos de prova, as muflas foram removidas da polimerizadora microprocessada digital e deixadas sobre a bancada para resfriar por um período de aproximadamente cinco horas. Após o resfriamento completo, procedeu-se a demuflagem (**Figura 1E**) dos corpos de prova medindo 10 mm x 10 mm x 4 mm, e os excessos (rebarbas) e a superfície de resina acrílica foram desgastados em politriz metalográfica (**Figura 1F**) com o auxílio de uma lixa d'água na granulação 80 (3M®, Sumaré, São Paulo, SP, Brazil) em politriz circular metalográfica (APL 4, Arotec®, Cotia, São Paulo, SP, Brazil) em baixa velocidade, sob refrigeração. A politriz metalográfica é capaz de realizar um polimento simultâneo e uma padronização de rugosidade e paralelismo entre as superfícies polidas por meio da tensão superficial com a interposição de uma gota de água.

A escolha da granulação da lixa de polimento tem como objetivo promover uma rugosidade superficial nos corpos de prova semelhante àquela encontrada na superfície interna da prótese total, capaz de facilitar a posterior adesão fúngica à superfície do acrílico (DA SILVA et al., 2011).

Em seguida, os corpos de prova foram submetidos à limpeza em ultrassom (**Figura 1G**) (Ultrasonic Cleaner® USC 700 Ind. E Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., Indaiatuba, SP, Brazil) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina (PEREIRA-CENSI et al., 2007). Posteriormente, todos os corpos de prova foram submergidos em aproximadamente 400 mL de água destilada e acondicionados em estufa a 37°C por 48 horas conforme as normas da ISO 1567:1998 (International Standard Organization. Specification 1567), visando a eliminação do monômero residual (**Figura 1H**). Por fim, todos os espécimes foram deixados ao ar livre para secagem. Aproximadamente 600 corpos de prova foram produzidos para o determinado estudo.

Para as leituras de rugosidade superficial, foi utilizado o aparelho rugosímetro (Surftest SJ-301, Mytutoio® Corporation, Kanagawa, Tokio, Japan) que constitui um aparelho de alta sensibilidade, com ponta apalpadora esférica de diamante, utilizada para medir rugosidade superficial quantitativamente. Essa ponta percorre a superfície e é acoplada a uma unidade que processa e interage a informação (**Figura 1I**). As mensurações foram feitas aleatoriamente sobre a superfície da cada quadrante dos corpos de prova, totalizando 3 leituras para cada espécime. O valor de rugosidade superficial de cada corpo de prova foi determinado pela média aritmética das leituras de cada um dos 4 quadrantes.

O parâmetro Ra (μm) traduz o valor da média aritmética de todas as distâncias absolutas do perfil de rugosidade, dentro de extensão de medida (percurso de medição 2 mm, comprimento de onda limite de 0,8 mm e velocidade de 0,5 mm/s (VALENTINI et al., 2013). O parâmetro Ra foi entre $2,0 \pm 2,5 \mu\text{m}$ para simular a rugosidade presente na superfície interna das próteses totais (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997; DA SILVA et al., 2011); aqueles corpos de prova que não estavam dentro desta medida foram descartados, os demais foram devidamente embalados em envelopes de esterilização (**Figura 1J**) e enviados para esterilização por meio de óxido de etileno (Acecil® – Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda., Campinas, SP, Brazil).

Figura 1. Confeção dos corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável. Placas de vidro, matriz acrílica e padrões de silicone confeccionados **(A)**. Mufla em prensa hidráulica **(B)**. Molde em gesso pedra III proporcionado pela imobilização dos padrões de silicone e molde de gesso em mufla preenchidos por resina acrílica termopolimerizável em sua fase plástica **(C)**. Mufla em prensa de aço inoxidável **(D)**. Corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável após a demuflagem **(E)**. Polimento e acabamento dos corpos de prova em politriz metalográfica com lixa d'água na granulação 80 **(F)**. Limpeza ultrassônica dos corpos de prova **(G)**. Corpos de prova imersos por 48 horas em água destilada para liberação do monômero residual **(H)**. Aferição da rugosidade superficial dos corpos de prova através de rugisímetro **(I)**. Corpo de prova devidamente embalado em envelope de esterilização **(J)**.

4.6 Tratamento da superfície dos corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável

Dentro da cabine de segurança microbiológica a temperatura ambiente (Mod. FLV-808/3, Filterflux®, Piracicaba, SP, Brazil), previamente desinfetada com álcool 70%, os corpos de prova foram retirados, com o auxílio de uma pinça estéril (S.S. White® Art. Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), do envelope de esterilização e foram colocados em placa de cultura de 24 poços (**Figura 2A**).

Em microtubos para centrifugação de 2 mL, as frações correspondentes a cada fitoterápico, ou seja, 30 mg da fração de diclorometano (**CH₂Cl₂**) para *E. giganteum* e 30 mg da fração de acetato de etila (**AcOEt**) para *P. granatum*, foram diluídas em 50 µL DMSO e misturadas a 10 mg do adesivo protético em pó (Corega® em Pó, GlaxoSmithKline Brasil Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brazil) (**Figura 2B**).

Neste trabalho, foi utilizado o adesivo protético COREGA® Pó, da empresa GlaxoSmithKline sediada em Brentford, Londres, Reino Unido, o qual é facilmente encontrado no Brasil. Este produto foi obtido na Rede Biodrogas Ltda., Bauru, SP, Brasil, em sua forma pó, facilitando a associação mecânica com os demais componentes (fitoterápicos e nistatina) (**Figura 2C**). A concentração de 10 mg/mL do adesivo foi determinada após a realização de estudos pilotos, tendo em vista o grau de solubilidade deste em água, a sua viscosidade, e o seu potencial de aderência sobre a resina acrílica.

Em cada microtubo, a mistura dos componentes (fitoterápicos e nistatina) com o adesivo, ou apenas o adesivo protético, foram suspensos em 1 mL de PBS (**Figura 2D**), e homogeneizados mecanicamente com o auxílio de um pincel estéril de cerdas macias (Pinctore – Pincéis Tigre®, nº 6, São Paula, SP, Brazil), até a dissolução completa de todos os constituintes (**Figura 2E**). Estas associações (adesivo/fitoterápico e adesivo/nistatina) constituíram uma suspensão contendo em sua totalidade 1% do adesivo protético (10 mg/mL).

Todo o volume da suspensão formada foi pincelado sobre a superfície de corpos de prova (**Figura 2F**) e estes foram mantidos por 50 minutos (**Figura 2G**), para a adesão completa de todos os componentes sobre a superfície. Em seguida, os corpos de prova foram retirados dos poços e, com o auxílio de uma pinça estéril, foram colocados em uma nova placa de 24 (**Figura 2H**) para secagem da

suspensão aderida em sua superfície (**Figura 2I**). Para este procedimento, as placas ficaram abertas dentro da cabine de segurança microbiológica durante 24 horas.

Como controles, superfície de corpos de prova foi tratada apenas com 10 mg/mL do adesivo protético em pó (COREGA® Pó, GlaxoSmithKline Brasil Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brazil), ou com a associação adesivo/nistatina (10 mg/mL de adesivo e 32 mg/mL de nistatina) (Farmácia Specifica Ltda., Bauru, SP, Brazil) (BUENO et al, 2015). Ainda, corpos de prova foram apenas mantidos em 1 mL de PBS (Phosphate Butter Solution, Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA).

Assim, os corpos de prova foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos (n=2 por grupo, em cada experimento):

Grupo AD: Superfície tratada apenas com o adesivo protético Corega® em pó (10 mg/mL);

Grupo AD/Eg: Superfície tratada com a associação adesivo protético (10 mg/mL)/30 mg da fração diclorometânica (**CH₂Cl₂**) de *E. giganteum*;

Grupo AD/Pg: Superfície tratada com a associação adesivo protético (10 mg/mL)/30 mg da fração de acetato de etila (**AcOEt**) de *P. granatum*;

Grupo AD/Nt: Superfície tratada com a associação adesivo protético (10 mg/mL)/32 mg/mL de nistatina;

Grupo PBS: Corpos de prova mantidos apenas em PBS, sem tratamento.

Figura 2. Tratamento da superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável. Cabine de segurança microbiológica, corpos de prova em placa de cultura de 24 poços (A). Mão direita- microtubo com 10 mg de adesivo protético COREGA®, mão esquerda - microtubo com 30 mg de (CH_2Cl_2) para *E. giganteum* ou 30 mg da fração de (AcOEt) para *P. granatum* previamente diluídos em DMSO (B). Associação mecânica do adesivo protético com *E. giganteum* ou *P. granatum* (C). Microtubo com a associação adesivo/fitoterápico sendo suspendida em 1 mL de PBS (D). Homogeneização mecânica da associação com o auxílio de um pincel estéril de cerdas macias até a dissolução completa de todos os constituintes (E). Mistura formada, sendo pincelada sobre a superfície de corpos de prova (F). Placa de 24 poços contendo os corpos de prova tratados ou não após 50 minutos (G). Retirada dos corpos de prova, com o auxílio de uma pinça estéril, para secagem da suspensão aderida em sua superfície (H). Corpos de prova tratados após 24 de secagem da suspensão (I).

4.7 Manipulação de *C. albicans* SC5314: obtenção da pré-cultura e padronização do inóculo

Visando aproximar as condições deste estudo in vitro daquelas encontradas clinicamente, todos os protocolos deste trabalho foram realizados com biofilme e não com células planctônicas de *C. albicans*. Além disso, com o intuito de aumentar a relevância clínica desta pesquisa utilizou-se uma cepa proveniente de um isolado clínico (SC5314), considerada mais virulenta quando comparada às cepas-padrão (GILLUM; TSAY; KIRSCH, 1984; KOLECKA et al., 2009; DA SILVA et al., 2010).

Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em condições assépticas, dentro da cabine de segurança microbiológica a temperatura ambiente (**Figura 3A**), previamente desinfetada com álcool 70%. A cepa do fungo *C. albicans* selvagem SC5314 foi cedida pelo Dr. Arnaldo Lopes Colombo, diretor técnico do Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo, e manipulada nas dependências do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), da FOB – USP.

O preparo do inóculo foi feito da seguinte maneira: as células mantidas a - 80°C foram reativadas da sua cultura original em solução contendo 20% de glicerol (CATALÁN et al., 2008), semeadas em placas contendo 20 mL meio de cultura YEPD (Yeast Extract Peptone – Dextrose Broth, Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) e incubadas a 37°C, durante 48 horas, em condições aeróbias em estufa bacteriológica (Mod. MA 033, Marconi® Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brazil) (ULUDAMAR; OZYESIL; OZCAN, 2008; DA SILVA, 2011).

Após o período de incubação, uma única colônia de *C. albicans* foi removida, ressuspensa em 50 mL de meio de cultura YEPD e mantida na incubadora com agitação orbital a 30°C, sob agitação 180 rpm overnight (aproximadamente 16 horas), resultando em uma pré-cultura (EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL; INFECTIOUS, 2000; RAMAGE et al., 2001). Uma alíquota de 5 mL da cultura foi retirada e colocada em tubos de 15 mL (TPP® 91015 - Techno Plastic Products, Trasadingen, SH, Switzerland) para centrifugação

a 4000 rpm por 5 minutos, para separação dos microorganismos do sobrenadante; em seguida, o sobrenadante foi desprezado.

A purificação das células foi feita através de lavagem do precipitado com 5 mL de PBS (Phosphate Buffer Solution, Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) e homogeneização em vórtex (Agitador de Tubos Tipo Vortex Mod. QL-901, Biomixer, Curitiba, PR, Brazil), seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, desprezando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes (RAMAGE et al., 2001).

O precipitado final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuspendido em 1 mL de PBS e diluído a 1:10000. Uma alíquota (**Figura 3B**) da diluição (10 µL) foi colocada em câmara de Neubauer para contagem de leveduras em microscópio óptico comum (DM4 M, Leica Microsystems, Ltda®, São Paulo, SP, Brazil) (BIZERRA et al. 2008). Depois de obtida a concentração final da suspensão, esta foi diluída em PBS para aquisição de inóculo em concentração de 1×10^7 células/mL (CHANDRA et al., 2001b; PAVAN et al., 2010) (**Figura 3C**).

Figura 3. Padronização do inóculo de *C. albicans* SC5314. Cabine de segurança microbiológica (A). Alíquota da suspensão celular (B). Contagem das leveduras de *C. albicans* por microscópio óptico comum em câmara de Neubauer para a padronização do inóculo a 1×10^7 células/mL (C).

4.8 Desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente tratados

Após o tratamento (AD, AD/Eg, AD/Pg, AD/Nt) ou não (PBS) da superfície dos corpos de prova e a padronização de *C. albicans*, os corpos foram colocados em placas de cultura de 24 poços e, sobre sua superfície, com o auxílio de ponteiros e pipetas descartáveis, foi pipetado 1 mL do inóculo de *C. albicans* (SC5314) na concentração de 1×10^7 células/mL. O tempo de adesão foi de 90 minutos a temperatura de 37°C, sob agitação de 75 rpm, em incubadora com agitação orbital (CHANDRA et al., 2001a; DA SILVA et al., 2010).

Cessados os 90 minutos, as células que não aderiram sobre a superfície da resina acrílica foram removidas através de lavagem, imergindo suavemente e individualmente os corpos de prova em 1 mL de PBS estéril. Na sequência, os corpos de prova foram submersos em 1 mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* RPMI-1640 (Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) (KUCHARIKOVA et al., 2011) e incubados a 37°C sob agitação de 75 rpm

(KUMAMOTO, 2002), durante o período de 3, 6 ou 12 horas, para indução do crescimento do biofilme (CHANDRA et al., 2001a; BIZERRA et al., 2008) .

O biofilme de *C. albicans* desenvolvido sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, tratados ou não, foi avaliado através da contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) ou por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT.

4.9 Quantificação do biofilme de *C. albicans* aderido sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente tratados ou não com a associação adesivo/*E. giganteum* ou *P. granatum*, por meio das unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Para a quantificação das células viáveis do biofilme de *C. albicans* aderido sobre a superfície de corpos de prova previamente tratados (**AD, AD/Eg, AD/Pg, AD/Nt**) ou não (**PBS**), foram realizados 3 experimentos independentes para cada período. Cessados os períodos (3, 6 e 12 horas) de indução do biofilme, cada corpo de prova foi retirado do poço da placa de cultura de 24 poços contendo meio de cultura RPMI-1640 com o auxílio de uma pinça estéril em seguida foram colocados, cuidadosamente, em outra placa de cultura de 24 poços e foram acrescentados 1 mL de PBS, de forma que o espécime ficou submerso na solução (**Figura 4A**).

Posteriormente, com o auxílio de um raspador de células (Raspadores de Células Costar® 3010, Corning Incorporated, Corning, New York, NY, USA) foi realizado o desprendimento das células fúngicas. O biofilme aderido sobre a superfície de todos os corpos de prova (previamente tratados ou não) foi raspado, delicadamente, dentro dos poços contendo PBS (**Figura 4B**) (TOBUDIC et al., 2009).

A partir de 1 mL desta suspensão fúngica formada, foram realizadas diluições seriadas em PBS, ou seja, 10^{-1} a 10^{-4} (**Figura 4C**). A diluição ideal para a contabilização das unidades formadoras de colônias foi obtida através de estudos piloto; para os períodos de 3 e 6 horas foi utilizada a diluição 10^{-3} e para o período de 12 horas foi utilizada a diluição 10^{-4} . Então, alíquotas de 50 µL dessa diluição foram plaqueadas em duplicatas, em placas de Petri contendo ágar Sabouraud

Dextrose com cloranfenicol, e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas (ESTIVILL et al., 2011).

Encerrado o período de incubação, as colônias viáveis do gênero *Candida* foram visualmente quantificadas realizando a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), e os valores transformados para número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Para esse cálculo, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$UFC/mL = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (3 ou 4), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição nas placas de Petri, sendo no presente estudo, $q = 0,050$, correspondente às alíquotas de 50 µL para cada diluição. Os valores médios de cada grupo foram devidamente catalogados para posterior avaliação estatística.

Figura 4. Quantificação do biofilme de *C. albicans* aderido sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente tratados ou não, por meio das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Corpos de prova previamente tratados ou não, sendo imersos em 1 mL de PBS em outra placa de 24 poços, após os períodos de indução do biofilme (A). Biofilme formado sobre a superfície dos corpos de prova imersos em PBS, sendo desprendido com o auxílio do raspador de células - **seta preta** (B). Placa de Petri com ágar Sabouraud Dextrose contendo as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) em PBS (C).

4.10 Avaliação da atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* aderido sobre a superfície de corpos de prova tratados ou não com a associação adesivo/ *E. giganteum* ou *P. granatum*, pelo ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT

A susceptibilidade de *C. albicans* à associação adesivo/fitoterápico (*E. giganteum* ou *P. granatum*) foi avaliada pelo percentual de redução da atividade metabólica do biofilme fúngico formado sobre os corpos de prova tratados com a associação. Esta análise foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT (2,3 Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenil) -5- [(Phenyl-Amino) Carbonyl] – 2H- Tetrazolium Hidroxide) (Sigma Aldrich® Inc., St Louis, MO, EUA) (HAWSER et al., 1998; CHANDRA et al., 2001b; RAMAGE et al., 2001; KUNH et al., 2003; REDDING et al., 2009).

Os sais de tetrazólio, de cor amarela, penetram rapidamente nas células intactas, ou seja, viáveis, sendo convertidos, por ação enzimática, em produtos de formazan de cor laranja (TELLIER et al., 1992; HAWSER et al., 1996; KUNH et al.,

2003). Estes produtos são solúveis em água, permitindo sua quantificação em espectrofotometria em sobrenadantes celulares (KUNH et al., 2003).

Neste estudo, as células fúngicas viáveis aderidas sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, tratada (**AD, AD/Eg, AD/Pg, AD/Nt**) ou não (**PBS**), foram avaliadas quanto a atividade metabólica, a partir da solução de XTT. É importante ressaltar que foram confeccionados corpos de prova independentes para cada período de avaliação, uma vez que a determinação da susceptibilidade aos fitoterápicos inviabiliza a sua reutilização.

Para a utilização do XTT, uma solução do sal foi preparada previamente na concentração de 1 mg/mL com água Milli-Q (Millipore Indústria e Comércio Ltda, Barueri, SP, Brazil), sendo esterilizada por filtração a vácuo (PES 70mm Diameter Membran, 0,22 μ m, pore size, TPP®, Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). A solução de XTT foi misturada com uma solução de menadiona (Sigma Aldrich® Inc., St Louis, MO, EUA), preparada com acetona na concentração de 1 mM e com PBS contendo 200 mM de glicose (DA SILVA et al., 2008).

Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período de avaliação (3, 6 e 12 horas de indução do biofilme de *C. albicans*). Cessado cada período de indução do biofilme, os corpos de prova previamente tratados ou não foram removidos, com o auxílio de uma pinça estéril, da placa de cultura de 24 poços contendo meio de cultura RPMI-1640, na qual o biofilme foi induzido (Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 1998). Em seguida, foram imersos, cuidadosamente, três vezes, em PBS, para retirada das células planctônicas e assim foram transferidos, individualmente, para outra placa de cultura de 24 poços, na qual foram submersos em 2 mL da solução de XTT (**Figura 5A**).

Na sequência, a placa de cultura contendo a solução de XTT, foi colocada em incubadora com agitação orbital (**Figura 5B**), sob velocidade de 75 rpm por 3 horas a 37°C para permitir a reação da solução de XTT sobre as células fúngicas (**Figura 5C**).

Após esse período, uma alíquota de 1,6 mL da solução de cada poço foi transferida, individualmente, para microtubos e, em seguida, estes foram submetidos a centrifugação a 10°C por 2 min, sob velocidade de 10.000 rpm para ocorrer a

decantação de possíveis células fúngicas presentes no sobrenadante (CHANDRA et al., 2001b; KUNH et al., 2003).

Do sobrenadante de cada microtubo, 200 uL foram transferidos, em triplicata, para uma placa de cultura de 96 poços (TPP® - Techno Plastic Products, Trasadingen Switzerland) (**Figura 5D**), a qual foi submetida a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Sinergy MX Monochromator Based Biotek® Winoosky, Vermont, USA) em comprimento de onda de 550 nm para a avaliação da atividade metabólica das células viáveis do biofilme de *C. albicans* (**Figura 5E**).

O conteúdo dos poços, referente a todos os corpos de prova previamente tratados ou não, inclusive os que não apresentaram coloração visível, também foram analisados. O valor encontrado para leitura da solução de XTT é denominado “branco”, que define uma absorbância mínima a ser descontada das demais leituras. Os valores coletados de todos os grupos experimentais foram descontados do “branco” (valor referente a leitura espectrofotométrica da solução de XTT), no mesmo comprimento de onda.

Foram utilizados corpos de prova, tratados ou não, porém ausentes da indução do biofilme de *C. albicans*, em todos os períodos, para descontar a coloração apresentada pela associação adesivo/fitoterápico (*E. giganteum* ou *P. granatum*), uma vez que, por meio de estudos piloto, visualizamos que ambos fitoterápicos reagiram com a solução de XTT (n=2, por fitoterápico, em cada período).

As porcentagens de redução da atividade metabólica das células viáveis do biofilme de *C. albicans*, na presença do adesivo associado ou não aos fitoterápicos (*E. giganteum* ou *P. granatum*), ou ainda associado a nistatina, foram calculadas a partir das densidades ópticas (DO) obtidas nos poços contendo os corpos de prova sem tratamento, ou seja, Grupo PBS (representando 100% de atividade metabólica), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{DO (\text{PBS}) - DO_{\text{experimental}} \times 100}{DO (\text{PBS})}$$

Figura 5. Avaliação da atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* aderido sobre a superfície de corpos de prova tratados ou não, pelo ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT. Corpos de prova tratados ou não, sendo imersos em 2 mL da solução de XTT, após os períodos de indução do biofilme **(A)**. Incubadora com agitação orbital Nova Ética® **(B)**. Placa de 24 poços contendo os corpos de prova tratados ou não, imersos na solução de XTT após 3 horas de incubação **(C)**. Placa de cultura de 96 poços contendo 200 uL em triplicata, de cada grupo experimental e controles **(D)**. Leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm **(E)**.

4.11 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados por meio da média $\pm$ desvio padrão (SD), e expressos de acordo com o padrão de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) apresentado. Como os valores de UFC/mL apresentaram grande variabilidade em cada experimento, não apresentando homogeneidade de variâncias, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os tempos e os grupos; e em paralelo, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para determinar as diferenças entre os grupos experimentais e os controles.

Os valores encontrados no ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio - XTT apresentaram o padrão de normalidade; então, foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (Two-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*), possibilitando a comparação entre os tempos e os grupos. Em paralelo, foi aplicado o teste Dunnett a fim de determinar as diferenças entre os grupos experimentais e os controles.

As médias dos valores obtidos em ambas as metodologias aplicadas (UFC/mL e XTT) foram submetidas ao teste de correlação de Spearman, possibilitando verificar a existência de correlação entre os resultados obtidos. A diferença foi considerada estatisticamente significativa, em todos os testes, quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Estudo fitoquímico de substâncias potencialmente ativas de *E. giganteum* e de *P. granatum*

Estudos fitoquímicos compreendem as etapas de extração, fracionamento, isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do material vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica. Esses conhecimentos permitem identificar a espécie vegetal e, conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou compostos bioativos (AREND et al., 2010).

Sendo assim, em nosso trabalho foi realizada a identificação dos compostos das partes aéreas de *E. giganteum* e das cascas do fruto de *P. granatum* da triagem cromatográfica por HPLC – PAD (*High Performance Liquid Chromatography – Photodiode Array Detector* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)

5.1.2 Identificação por HPLC-PAD

Considerando as técnicas de detecção atuais, a triagem cromatográfica por HPLC com detector de fotodiodos (PAD) é uma importante metodologia de “fingerprints” de matrizes vegetais (CUYCKENS; CLAEYS, 2000; CUYCKENS; CLAEYS 2002; RIJKE et al., 2006; HARNLY; LIN, 2007). Esta, por sua vez, permite uma rápida tipificação da composição da matriz vegetal estudada através dos tempos de retenção e/ou propriedades espectrométricas, todas associadas às características intrínsecas de cada substância, como polaridade, massa molecular, entre outros (SNYDER et al., 1997; ARDREY, 2003).

E. giganteum

O *screening* por HPLC-PAD do extrato bruto (**EtOH 70%**) e das frações (**CH₂Cl₂, AcOEt, *n*-BuOH e H₂O**), resultante da percolação das partes aéreas de *E. giganteum*, revelou 16 compostos (**Tabela 1**) por meio da combinação da interpretação do tempo de retenção e dos espectros na região do UV para os picos

obtidos por meio do detector PAD realizando varredura na faixa espectral de 200 a 600 nm (**Figura 9**).

Picos com absorção na faixa espectral de 240 e 290 nm são reconhecidos por representarem a Banda II que é atribuída ao anel A, o qual envolve a absorção do sistema benzoil. Picos com absorção na faixa 300 a 390 nm são reconhecidos por representarem a Banda I que é atribuída ao anel B, o qual envolve a absorção do sistema cinamoil; esse tipo de sistema é característico de compostos da classe dos flavonoides (BECCHI; FRAISSE, 1989; ANDERSEN; MARKHAM 2008). E picos com bandas de absorção com máximos na região do UV em 253 e 258 nm e entre 355 e 373 nm, sugerem a presença de compostos derivados de pironas (BECKERTA et al., 1997).

A complexidade evidenciada na fração diclorometânica (**CH₂Cl₂**) tornou difícil a detecção dos compostos presentes nessa fração da matriz vegetal quando observado o tempo total de uma corrida, uma vez que os picos demonstraram-se muito pequenos inviabilizando a identificação precisa dos compostos. Tendo em vista a especificidade deste método, podemos afirmar que a maioria dos compostos presentes na fração diclorometânica são menos polares, ou apresentam média polaridade. Sendo assim, métodos de detecção de compostos mais apolares deverão ser incorporados para se obter uma análise mais precisa sobre a composição desta fração (**Figura 6**).

O extrato bruto (**EtOH 70%**) e fração aquosa (**H₂O**) obtiveram um padrão semelhante de corrida. As frações **AcOEt** e **n-BuOH** demonstram possuir em sua composição compostos mais polares; sendo assim, podemos facilmente visualizar mais picos durante a corrida nestas frações, os espectros de ultravioleta (UV) comparados com aqueles observados na literatura (ALAVARCE et al., 2015) nos confirmam a presença de heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina (**Figura 7**) e kaempferol (**Figura 8**), além de equisetumpirona.

Embora a fração diclorometânica tenha apresentando um perfil apolar, inviabilizando a identificação de compostos com polaridade alta pela análise em HPLC-PAD, nas demais frações desta matriz vegetal, foi possível identificar a presença de metabólitos secundários da classe dos flavonoides. Sendo assim, levamos em consideração o potencial antifúngico desta fração (**CH₂Cl₂**) contra *C. albicans* observado no protocolo de UFC/mL, utilizando-a ao longo deste trabalho. Entretanto, metodologias que identificam compostos menos polares associadas a

identificação por meio da análise em espectrometria de massas (MS) serão adicionadas futuramente para uma detecção precisa sobre os compostos desta fração.

Figura 6. Cromatograma analítico obtido por HPLC-PAD do extrato bruto (EtOH 70%) e das frações (CH_2Cl_2 , AcOEt, n -BuOH e H_2O) das partes aéreas de *E. giganteum*. Solventes MeOH + Ác. Form. 0,1% (A) e H_2O + Ác. Fórm. 0,1% (B). Gradiente: 20-35% de A em B por 25 min e 35-65% em 45 min. Coluna Phenomenex® Luna C18 (250 x 4,6 mm d.i., 5 μm), HPLC (Jasco®). Forno de coluna: 40°C. Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Vol. injeção: 15 μL . λ = 254 nm. Os picos estão numerados de acordo com os compostos listados na Tabela 1.

Figura 7. Quercetina. Estrutura molecular

Figura 8. Kaempferol. Estrutura molecular

Figura 9. Espectros de ultravioleta (UV) dos picos obtidos na análise cromatográfica por HPLC-PAD de *E. giganteum*.

Tabela 1. Compostos identificados a partir das partes aéreas de *E. giganteum* por HPLC-PAD. A sigla n.i. representa os compostos não identificados.

Picos	Possível Composto	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$
1	n.i.	2,43	296
2	n.i.	4,04	296
3	n.i.	5,77	260, 296
4	Derivado de kaempferol	7,05	266, 344
5	n.i.	7,19	266, 344
6	n.i.	7,23	284, 308
7	n.i.	7,55	290, 314
8	n.i.	8,65	254, 332
9	n.i.	9,84	296
10	n.i.	10,16	296
11	Derivado de quercetina	10,36	302, 326
12	Derivado de kaempferol	13,45	266, 344
13	n.i.	18,17	260, 344, 386
14	n.i.	18,69	326
15	Equisetumpirona	24,96	272, 332, 380
16	Derivado de quercetina	30,56	266, 350

P. granatum

O *screening* por HPLC-PAD do extrato bruto (**EtOH 70%**) e das frações (**AcOEt, *n*-BuOH e H₂O**), resultante da percolação das cascas do fruto de *P. granatum*, revelou, novamente, 16 compostos (**Tabela 2**) por meio da combinação da interpretação do tempo de retenção e dos espectros na região do UV (**Figura 13**).

Foram registrados picos com absorção na faixa espectral de 254 a 380 nm, 260 a 380 nm e 254 a 362 nm nesta matriz vegetal, os quais a maioria estavam presentes na fração **AcOEt** quando observado o tempo total de uma corrida (**Figura 10**). Estes espectros são característicos da classe dos taninos, derivados de elagitaninos, apresentando picos com bandas de absorção do sistema benzílico (STICHER, 2008; GARCÍA-VILLALBA et al., 2015).

Comparando nossos achados com os dados encontrados na literatura, os picos, detectados a partir da triagem cromatográfica por HPLC-PAD, indicam a possível presença de derivados de elagitaninos (**Figura 11**), derivados de ácido gálico e heterosídeos de ácido elágico, como a punicalina (**Figura 12**) na fração **AcOEt**. (STICHER, 2008; ENDO et al., 2010; ANIBAL et al., 2013; GARCÍA-VILLALBA et al., 2015). Com esta fração, obtivemos o melhor resultado em relação à atividade antimicrobiana frente a *C. albicans*. O extrato bruto (**EtOH 70%**) e fração butanólica (***n*-BuOH**) obtiveram padrão semelhante de corrida e a fração aquosa (**H₂O**) foi a que obteve a menor quantidade de compostos detectados.

Figura 10. Cromatograma analítico obtido por HPLC-PAD do extrato bruto (**EtOH 70%**) e das frações (**AcOEt**, ***n*-BuOH** e **H₂O**) das cascas do fruto de *P. granatum*. Solventes MeOH + Ác. Form. 0,1% (A) e H₂O + Ác. Fórm. 0,1% (B). Gradiente: 5-100% de A em B por 60 min. Coluna Phenomenex® Luna C18 (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), HPLC (Jasco®). Forno de coluna: 40°C. Fluxo: 1 ml.min⁻¹. Vol. injeção: 15 µL. λ = 254 nm. Os picos estão numerados de acordo com os compostos listados na Tabela 2.

Figura 11. Punicalagina. Estrutura molecular

Figura 12. Punicalina. Estrutura molecular

Figura 13. Espectros de ultravioleta (UV) dos picos obtidos na análise cromatográfica por HPLC-PAD de *P. granatum*.

Tabela 2. Compostos identificados a partir do extrato das cascas dos frutos de *P. granatum* por HPLC-PAD. A sigla n.i. representa os compostos não identificados

Picos	Possível Composto	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$
1	Punicalina	3,28	254, 380
2	n.i.	7,17	266, 380
3	Derivado de elagitanino	9,26	260, 380
4	n.i.	11,35	254, 380
5	Derivado de elagitanino	12,0	260,380
6	Ác. Vanoleico dilactona	12,36	254, 374
7	n.i.	14,17	260, 374
8	n.i.	14,33	260, 374
9	n.i.	15,53	278
10	Derivado de ácido gálico	17,39	272
11	n.i.	18,03	266
12	Derivado de ácido elágico	22,29	254, 362
13	Derivado de ácido elágico	24,59	254, 362
14	Derivado de ácido elágico	25,64	254, 362
15	Derivado de ácido elágico	26,65	254, 362
16	Derivado de ácido elágico	28,88	254, 368

5.2 Quantificação do biofilme fúngico formado sobre a superfície da resina acrílica termopolimerizável, previamente tratada com a associação adesivo/*E. giganteum* ou *P. granatum*, por meio das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)

O biofilme de *C. albicans* desenvolvido sobre a superfície dos corpos de prova não tratados (**PBS**) resultou nos valores mais altos de UFC/mL, em todos os períodos (3, 6 e 12 horas) (**Tabela 3**). Em cada um dos períodos avaliados individualmente, o adesivo interferiu no crescimento das células fúngicas aderidas sobre a superfície da resina acrílica, visto que o biofilme aderido nos corpos de prova tratados apenas com o adesivo (**AD**) apresentou valores de UFC/mL menores em relação àqueles sem tratamento (**PBS**) (**Gráfico 1**).

Em comparação ao grupo **AD**, os corpos de prova tratados com adesivo associado aos fitoterápicos (**AD/Eg** e **AD/Pg**) demonstraram uma redução significativa do biofilme de *C. albicans* aderido sobre a sua superfície, em todos os períodos avaliados ($p=0,000424$, $0,000235$, $0,006349$, respectivamente a 3, 6 e 12

horas em **AD/Eg** e $p=0,001273$, $0,007518$, $0,047465$, respectivamente a 3, 6 e 12 horas em **AD/Pg**).

Sendo assim, ambos os fitoterápicos (*E. giganteum* e *P. granatum*) amplificaram a ação antifúngica observada com o adesivo. Os valores de UFC/mL obtidos após os tratamentos com os fitoterápicos foram semelhantes, independente da planta.

Como esperado, o grupo controle **AD/Nt**, em todos os períodos, demonstrou os menores valores de crescimento fúngico, diferindo dos outros grupos, independente do período de formação do biofilme (**Figura 14**).

Figura 14. Comparação, em relação aos controles AD, AD/Nt e PBS, das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) do biofilme de *C. albicans* induzido por 3, 6 e 12 horas (h) sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente tratados com a associação adesivo/*E. giganteum* (AD/Eg) e a associação adesivo/*P. granatum* (AD/Pg). As siglas AD e AD/Nt representam corpos de prova tratados apenas com o adesivo ou com o adesivo associado a nistatina, respectivamente, enquanto que a sigla PBS representa os corpos de prova não tratados. Letras diferentes representam $p < 0,05$, para cada período individualmente. Resultados expressos pela média $\pm$ desvio padrão (SD), e apresentados de acordo com o teste de Mann-Whitney para determinar as diferenças entre os grupos experimentais e os controles. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período em triplicata.

Avaliando os biofilmes ao longo do tempo, na ausência de tratamento (PBS) bem como após o tratamento com o adesivo (associado ou não com os fitoterápicos), houve maior crescimento fúngico na superfície da resina no período de 12 horas, em relação aos anteriores. Os corpos de prova tratados com a associação adesivo/nistatina (AD/Nt), após 3 horas de indução do biofilme, não apresentaram crescimento fúngico sobre sua superfície. Entretanto, demonstraram valores de UFC/mL acima de 10^3 nos períodos subsequentes, os quais foram superiores após 12 horas em relação a 6 horas (Figura 15).

Figura 15. Comparação, ao longo do tempo, das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) do biofilme de *C. albicans* induzido sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável tratados com a associação adesivo/nistatina (AD/Nt) ou com o adesivo associado ou não (AD) aos fitoterápicos *E. giganteum* e *P. granatum* (AD/Eg e AD/Pg), por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio - XTT. * representa $p < 0,05$ em relação ao período de 3 horas; # representa $p < 0,05$ em relação aos períodos de 3 e 6 horas, para cada grupo individualmente e (g) representa os grupos experimentais e controles. Resultados expressos pela média $\pm$ desvio padrão (SD), e apresentados de acordo com o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os tempos e os grupos. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período em triplicata.

5.3 Redução da atividade metabólica do biofilme fúngico formado sobre a superfície da resina acrílica termopolimerizável, previamente tratada com a associação adesivo/*E. giganteum* ou *P. granatum*, por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT

Em concordância com os resultados de UFC/mL, a partir dos quais ficou clara a susceptibilidade das células fúngicas frente ao tratamento dos corpos de prova com os fitoterápicos, os dados obtidos por meio do ensaio XTT revelaram que a presença de *E. giganteum* e *P. granatum* está associada com maior percentual de redução da atividade metabólica do biofilme aderido em comparação ao tratamento apenas com o adesivo (**AD**), em todos os períodos (**Tabela 3**). Sendo assim, verificou-se novamente que ambos os fitoterápicos amplificam a capacidade do adesivo em interferir no biofilme fúngico aderido sobre a superfície da resina acrílica termopolimerizável. Porém, neste caso houve diferença significativa entre os valores de redução metabólica, na comparação entre as diferentes plantas em todos os períodos ($p=0,000021$; $0,000022$; $0,000049$, respectivamente a 3, 6 e 12 horas). No período de 3 horas, a redução obtida após o tratamento com *E. giganteum* foi semelhante àquela observada na presença da nistatina ($p=0,059$) (**Figura 16**).

Como esperado, a nistatina reduziu de forma expressiva o metabolismo de *C. albicans* aderido na resina acrílica, em todos os períodos, com valores acima de 95% (média). Esses valores foram superiores em comparação aos demais grupos (**Figura 16**).

Figura 16. Comparação, em relação aos controles AD e AD/Nt, do percentual (%) de redução da atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* induzido por 3, 6 e 12 horas (h) sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável tratados com a associação adesivo/*E. giganteum* (AD/Eg) e a associação adesivo/*P. granatum* (AD/Pg), por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio - XTT. As siglas AD e AD/Nt representam os corpos de prova tratados apenas com o adesivo ou com o adesivo associado a nistatina, respectivamente. Letras diferentes representam $p < 0,05$, para cada período individualmente. Resultados expressos pela média $\pm$ desvio padrão (SD) e apresentados de acordo o teste Dunnett a fim de determinar as diferenças entre os grupos experimentais e os controles. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período em triplicata. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período em triplicata.

Com relação ao tempo de desenvolvimento do biofilme, para cada grupo individualmente, o percentual de redução da atividade metabólica, das células fúngicas aderidas sobre os corpos de prova, foi variável entre os períodos, nos grupos **AD**, **AD/Eg** e **AD/Pg**. Nos grupos **AD** e **AD/Pg**, a redução foi maior no período de 6 horas, em relação aos outros períodos. Nos grupos **AD** e **AD/Eg**, o percentual foi menor no período de 12 horas em relação àqueles observados nos períodos anteriores. No grupo **AD/Nt**, a redução da atividade metabólica foi similar ao longo do tempo, demonstrando valores que variavam de 95 a 98% (média) (Figura 17 e Tabela 3).

Figura 17. Comparação, ao longo do tempo, do percentual (%) de redução da atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável tratada com a associação adesivo/nistatina (AD/Nt) ou com o adesivo associado ou não (AD) aos fitoterápicos *E. giganteum* e *P. granatum* (AD/Eg e AD/Pg), por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio - XTT. * representa $p < 0,05$ em relação aos outros períodos; # representa que todos os períodos diferem entre si, para cada grupo individualmente ($p < 0,05$) e (g) representa os grupos experimentais e controles. Resultados expressos pela média $\pm$ desvio padrão (SD) e apresentados de acordo a Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (Two-Way), seguida do teste post-hoc de Tukey HSD (Honest Significant Difference), possibilitando a comparação entre os tempos e os grupos. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período em triplicata.

Tabela 3. Valores (média) de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e do percentual de redução de atividade metabólica por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT, obtidos a partir do biofilme aderido na superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, tratados (AD, AD/Eg, AD/Pg e AD/Nt) ou não (PBS), no período de 3, 6 e 12 horas.

	3 horas		6 horas		12 horas	
	UFC/mL (10^3)	XTT (%)	UFC/mL (10^3)	XTT (%)	UFC/mL (10^3)	XTT (%)
AD	157,7	44,5	281,2	57,9	519,4	33,6
AD/Eg	26,2	82,3	42,8	80,9	326,6	72,9
AD/Pg	33,6	58,2	80	63,2	241	58,4
AD/Nt	0	98,1	1,6	97,5	4,4	95,4
PBS	867,7	0	1012	0	1616	0

Com relação às metodologias utilizadas neste trabalho (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro - UFC/mL e o ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio - XTT), foi aplicado o teste de correlação de Spearman sobre as médias dos valores obtidos pelos diferentes grupos (**AD, AD/Eg, AD/Pg, AD/Nt e PBS**), nos períodos de 3, 6 e 12 horas (**Tabela 3 e Figura 18**). Por meio deste teste, foi possível observar que os valores apresentaram uma correlação negativa forte e significativa ($r = -0,90$ e $p < 0,001$) (**Figura 18**).

Figura 18. Correlação entre as médias dos resultados, correspondentes ao crescimento do biofilme de *C. albicans*, aderido sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica, obtidas por meio de duas metodologias diferentes: contagem das Unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) – eixo X *versus* ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio (XTT) – eixo Y. As médias referem-se aos resultados obtidos a partir de todos os grupos (AD, AD/Eg, AD/Pg, AD/Nt e PBS) e períodos (3, 6 e 12 horas). Houve uma forte e significativa correlação negativa entre as médias dos valores obtidos a partir de cada metodologia aplicada ($r = -0,90$ e $p < 0,001$ – teste de correlação de Spearman). * representa $p < 0,05$ entre os valores correlacionados (demonstrados na Tabela 3).

6 *Discussão*

6 DISCUSSÃO

Uma vez que as plantas constituem importantes fontes de novas identidades moleculares (HARVEY, 2000; MUNARI et al., 2010; REGNER et al., 2011; GOYAL; GUPTA; CHATTERJEE, 2016) e há a necessidade de métodos alternativos e biocompatíveis para colaborar com o tratamento ou para prevenir a EP, este estudo foi delineado com o objetivo de verificar o potencial antimicrobiano dos fitoterápicos, *E giganteum* e *P. granatum*, frente ao desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, quando incorporados a um importante material odontológico utilizado para retenção e estabilização de próteses totais removíveis: o adesivo protético.

Para tal, optamos por utilizar duas metodologias: a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e o ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio (XTT), baseado na verificação da atividade mitocondrial. Por meio deste ensaio, é possível detectar, através das desidrogenases mitocondriais, as leveduras e hifas metabolicamente ativas no biofilme, as quais podem ser consideradas viáveis (HAWSER, 1996; HAWSER et al., 1998; JIN et al., 2003; SENEVIRATNE et al., 2009; COSTA et al., 2013). No entanto, estabelecer com precisão a viabilidade de uma célula fúngica é considerado particularmente difícil, quando se necessita avaliar a eficácia de agentes antifúngicos (JIN et al., 2003; NETT et al., 2011), já que alguns fatores parecem influenciar os resultados do ensaio XTT, como o período de crescimento do biofilme de *Candida* spp., as alterações genéticas na parede celular fúngica e a composição da matriz exopolissacarídica (NETT et al., 2007; NETT et al., 2008; UPPULURI et al., 2008; NETT et al., 2010). Sendo assim, não podemos confirmar uma relação linear entre o número de microorganismos viáveis e o sinal colorimétrico fornecido durante a realização do ensaio XTT (TOBUDIC et al., 2009; NETT et al., 2011), o que significa a possibilidade de uma avaliação equivocada sobre viabilidade.

Embora conclusões a partir dos resultados obtidos exclusivamente por este ensaio devam ser feitas com precaução, levando em consideração suas limitações (KUNH et al., 2002a; KUNH et al., 2002b; KUNH et al., 2003), o ensaio XTT vem sendo amplamente utilizado para a detecção de biofilmes fúngicos, nas investigações direcionadas ao potencial antimicrobiano de fármacos (HAWSER et al., 1998; CHANDRA et al., 2001b; JIN et al., 2003; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006;

MELO; COLOMBO; ARTHINGTON-SKAGGS, 2007; JACOBSON et al., 2009; SENEVIRATNEA et al., 2009; TAFF, NETT, ANDES, 2011; NETT et al., 2011), demonstrando ser mais sensível, reprodutível e eficiente em comparação aos demais métodos convencionais de baixo custo (DHALE; GHORPADE; DHARMADHIKARI, 2014).

A análise do desenvolvimento do biofilme de *Candida* spp., baseada na contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), é um método comumente utilizado para pesquisas sobre a ação antimicrobiana de fármacos (SENEVIRATNEA et al., 2009; COSTA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011a; ESTIVILL et al., 2011). Por meio deste método, é possível estimar o número de células microbianas viáveis, com base na sua capacidade de originar colônias sob condições específicas em determinado meio de cultura. Adota-se que cada colônia contabilizada foi originada por uma única célula microbiana viável, e os resultados são expressos em UFC/mL (GOLDMAN; GREEN, 2014). Embora a viabilidade da célula fúngica contabilizada seja um fato inquestionável utilizando esta metodologia, a mesma também apresenta suas limitações, já que biofilmes de *C. albicans* possuem morfologias distintas (blastósporos, pseudo-hifas e hifas), resultando, portanto, em variabilidade na quantificação entre amostras de um mesmo grupo. Consequentemente, esta variabilidade pode representar um problema significativo no que diz respeito à reprodutibilidade por meio da contagem de UFC/mL, especialmente para *C. albicans* (SENEVIRATNEA et al., 2009; SRINIVASAN et al., 2011). Além disso, para a realização da contagem de UFC/mL, em nosso modelo experimental, foi necessário realizar a raspagem mecânica do biofilme aderido sobre a superfície dos corpos de prova. Devemos contar com a possibilidade que esta manobra possa lesar as células fúngicas; neste caso, resultados distintos podem ser obtidos em um mesmo grupo, seja ele experimental ou controle.

A análise de correlação é um dos métodos estatísticos mais utilizados na pesquisa médica e científica. Esta análise é utilizada para determinar se existe relação entre duas variáveis distintas e, se sim, o quão forte é a relação entre elas. O coeficiente de correlação (r) é uma ferramenta estatística usada para medir o grau ou a força de tal relacionamento. Ele indica se as variáveis estão linearmente ou inversamente relacionadas (WEBER; LAMB, 1970). O valor de r requer tanto uma magnitude como um sentido (positivo ou negativo), podendo estar entre um intervalo de valores de -1 a 1, onde os valores são absolutos e sem unidades envolvidas. Um

coeficiente de correlação zero indica que não existe nenhuma relação entre as variáveis medidas. Quanto mais o valor de r se aproxima de ± 1 , independentemente da direção, mais forte é a associação existente, indicando uma relação linear (+) ou inversa (-) entre as duas variáveis. A força da correlação é independente da direção ou do sinal. Assim, $r = 0,90$ e $r = -0,90$ são iguais na força da relação das medidas das variáveis. Um coeficiente de correlação positivo indica que um aumento na primeira variável corresponderá a um aumento na segunda variável, ou seja, uma relação direta (linear) entre as variáveis. Um coeficiente negativo indica uma relação inversa entre as variáveis, ou seja, quando a primeira variável aumenta, a segunda diminui (TAYLOR, 1970).

Sendo assim, de acordo com o teste de correlação de *Spearman*, verificamos que existe uma correlação negativa (inversa) forte entre as médias dos valores obtidos pelas duas diferentes metodologias utilizadas ($r = -0,90$). Isso quer dizer que, em todos os grupos (**AD, AD/Eg, AD/Pg, AD/Nt e PBS**), na medida em que o biofilme de *C. albicans* se desenvolveu sobre a superfície dos corpos de prova de resina acrílica (observado por meio do método de UFC/mL ao longo do tempo), houve uma diminuição do percentual de redução da atividade metabólica do biofilme fúngico (detectado no ensaio XTT).

Por fim, quanto às metodologias utilizadas no presente trabalho, acreditamos na importância da utilização de mais de um método, quando o objetivo é investigar a ação antifúngica de fitoterápicos e medicamentos sintéticos frente a biofilmes de *C. albicans*. Além disso, tendo em vista a correlação detectada entre as metodologias, consideramos que ambas se complementaram para tal investigação, proporcionando um melhor entendimento da ação dos fármacos sobre os microrganismos. Esta ideia da complementaridade pode ser fortalecida ao observarmos nossos resultados referentes ao grupo envolvendo a nistatina, utilizada como um parâmetro de comparação visto seu forte potencial antifúngico frente a *C. albicans* (KERRIDGE; NICHOLAS, 1986; ROSATO et al., 2009). No período de 3 horas de indução, não observamos crescimento fúngico, pelo método de UFC/mL, sobre a resina tratada com nistatina (**AD/Nt**); porém a redução da atividade metabólica de *C. albicans* não alcançou 100%, e sim aproximadamente 98%. Isto significa que o ensaio XTT demonstrou a presença de células metabolicamente ativas remanescentes, as quais não foram detectadas pelo método baseado na contagem das UFC/mL. Somente após este período inicial de 3 horas, ou seja, após

6 e 12 horas, foi possível contabilizar colônias de *C. albicans*. Possivelmente, as células metabolicamente ativas remanescentes, embora em pequeno número, só foram capazes de proliferar de forma significativa nos períodos posteriores. Acreditamos assim que os dois métodos de investigação, por nós aplicados, apresentam diferentes sensibilidades, para um mesmo fim, e foram, portanto, complementares durante a análise e o raciocínio dos resultados obtidos neste trabalho.

Os benefícios de *E. giganteum* contra a formação de biofilme de *C. albicans* já foram previamente observados pela nossa equipe (ALAVARCE et al., 2015). Este fitoterápico possui as seguintes propriedades: ação antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*, ação antiaderente em *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável e ação anti-inflamatória sobre monócitos humanos ativados por *C. albicans*. Além disso, o fitoterápico não comprometeu a viabilidade de monócitos humanos ou de células epiteliais de palato humano. Simultaneamente, o extrato bruto (EtOH 70%) de *E. giganteum* revelou a presença de compostos fenólicos derivados do ácido cafeico e ácido ferúlico, e de heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina do kaempferol, além de estirilpironas.

Os flavonoides são produzidos através do metabolismo secundário das plantas, atuando na defesa contra infecções, doenças cardiovasculares e câncer (KUMAR; PANDEY, 2013). Estes compostos possuem a capacidade de inativar adesinas, que são proteínas responsáveis pela adesão das células fúngicas sobre o substrato para indução da formação do biofilme. Além disso, os flavonoides inativam algumas proteínas carreadoras, alteram a permeabilidade da membrana das células fúngicas (COWAN, 1999; CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011; KUMAR; PANDEY, 2013) e causam estresse oxidativo na matriz de biofilmes de *C. albicans*, prejudicando portanto o seu crescimento (PERALTA et al., 2015).

Mesmo associado a um material odontológico, *E. giganteum* novamente demonstrou seu potencial antifúngico, fortalecendo a ideia de sua utilização na prevenção do desenvolvimento da EP. De acordo com o presente trabalho, o tratamento da resina acrílica termopolimerizável com a associação adesivo/*E. giganteum* (**AD/Eg**) interferiu no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* aderido em sua superfície, quando comparado ao grupo sem tratamento (**PBS**), resultando em redução significativa das UFC/mL até 12 horas de indução do biofilme.

Concomitantemente, o tratamento com esta associação (**AD/Eg**) resultou em redução percentual da atividade metabólica das células fúngicas aderidas, com médias de aproximadamente 82%, 81% e 73%, após 3, 6 e 12 horas respectivamente. Vale ressaltar que, no período de 3 horas pós-indução do biofilme, o percentual de redução da atividade metabólica de *C. albicans* foi semelhante àquele observado após tratamento da resina acrílica com a associação adesivo/nistatina (**AD/Nt**). Possivelmente, os derivados de flavonoides presentes em *E. giganteum*, identificados por meio da análise em HPLC-PAD e os possíveis compostos apolares presentes na fração **CH₂Cl₂** sejam os constituintes responsáveis por este efeito antimicrobiano.

De maneira semelhante, o tratamento da resina acrílica com a associação adesivo/*P. granatum* (**AD/Pg**) também prejudicou o desenvolvimento do biofilme aderido, pois resultou em diminuição de UFC/mL e em redução da atividade metabólica das células fúngicas até 12 horas após a indução do biofilme. Recentemente, tem sido verificado que punicalagina, pedunculagina, telimagrandina e galagildilactona, identificados no extrato bruto hidroalcoólico extraído das cascas de *P. granatum*, possuem atividade antifúngica, causando sérios danos para a estrutura celular das leveduras de *C. albicans* (ANIBAL et al., 2013). Neste contexto, o principal composto envolvido na ação antifúngica de *P. granatum* parece ser a punicalagina (ENDO et al. 2010; ANIBAL et al., 2013; GARCÍA-VILLALBA et al., 2015).

De fato, a fração **AcOEt**, utilizada no presente trabalho, apresentou em sua composição: ácido elágico, hererosídeos de ácido elágico e elagitaninos, como a punicalina, após análise utilizando HPLC-PAD. A punicalina é um composto derivado da punicalagina (GARCÍA-VILLALBA et al., 2015). Esses achados fitoquímicos corroboram aqueles encontrados na literatura (ENDO et al. 2010; ANIBAL et al., 2013; GARCÍA-VILLALBA et al., 2015). Assim, acreditamos que estes taninos sejam os principais compostos envolvidos na redução do biofilme fúngico, observada no grupo **AD/Pg**.

Entretanto, não podemos ainda esclarecer com exatidão qual o mecanismo responsável pela inibição do biofilme fúngico formado sobre a superfície da resina acrílica observada nos grupos nos quais os fitoterápicos estavam presentes (**AD/Eg e AD/Pg**), uma vez que estes podem atuar em diferentes

estruturas das células fúngicas, durante a formação do biofilme (BRAGA et al., 2008; LIU, 2013).

Em nosso modelo experimental *in vitro*, verificamos ainda que o tratamento da superfície da resina acrílica com o adesivo protético (COREGA®) não associado (**AD**) resultou na redução do crescimento do biofilme de *C. albicans* aderido, quando comparado aos corpos de prova ausentes de tratamento (**PBS**), bem como na redução da atividade metabólica das células fúngicas, com valores aproximados que variaram de 44% a 34%, com o passar do tempo de indução. Na composição do COREGA®, não existe um componente com potencial antifúngico, entretanto este adesivo possui polietilenoglicol (PEG) (informações contidas na embalagem do produto/ lote TA0082V), um polímero solúvel em água e eficiente na adsorção de proteínas (BERGSTROM et al., 1992; ALIBEIK; ZHU; BRASH, 2010), cuja presença reduz de forma significativa a interação das células microbianas com a superfície do biomaterial, por compor uma barreira física (PARK et al., 1998; XU; SIECLECKI, 2012; XU; SIECLECKI, 2014; XU; SIECLECKI, 2015). Por esta razão, o PEG parece ser um componente eficiente na prevenção de infecções microbianas (XU; SIECLECKI, 2015). Em nosso trabalho, tendo em vista esta capacidade de controlar o processo de formação do biofilme, possivelmente o PEG, presente no COREGA®, tenha sido o fator ou um dos fatores responsáveis pela diminuição da colonização de *C. albicans*, prejudicando o desenvolvimento do biofilme sobre a superfície da resina tratada com este material.

De forma interessante e com potencial inovador, nossos resultados atuais revelaram que o COREGA®, quando associado ao *E. giganteum* e *P. granatum*, (**AD/Eg ou AD/Pg**), resultou em maior redução de atividade metabólica bem como menor crescimento de UFC/mL de *C. albicans* sobre a superfície da resina acrílica, em comparação ao grupo **AD**. Isso significa que a incorporação dos fitoterápicos no adesivo protético amplificou a sua capacidade em interferir no desenvolvimento do biofilme fúngico, em todos os períodos avaliados.

Comparando-se com a nistatina, sabidamente um potente antifúngico, a associação do adesivo com *E. giganteum* ou *P. granatum*, utilizada no presente trabalho, apresentou um menor efeito antimicrobiano. Como esperado, a nistatina resultou nos menores valores de UFC/mL e nos maiores percentuais de redução da atividade metabólica das células fúngicas aderidas sobre a superfície da resina acrílica, em todos os períodos de indução do biofilme, em comparação aos demais

grupos experimentais. De forma semelhante aos nossos achados, Mansourian et al. (2014) observaram que a amplitude da atividade antifúngica de *P. granatum* sobre *C. albicans* é inferior a nistatina.

Porém, acreditamos que, mesmo apresentando potencial antifúngico inferior ao da nistatina, a associação do adesivo com os fitoterápicos foi eficiente na ação contra o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* sobre a superfície da resina acrílica. Este benefício, observado nos grupos **AD/Eg** e **AD/Pg**, torna-se ainda mais importante, do ponto de vista clínico, se refletirmos sobre os efeitos colaterais ou indesejáveis causados pelo uso local da nistatina, como por exemplo, mau gosto, diarreia, náuseas, vômito, dor epigástrica e principalmente a recorrência do quadro inflamatório, mediante a resistência de *C. albicans* aos antifúngicos convencionais utilizados no tratamento da EP (MANSOURIAN et al., 2014). Além disso, para atingir um tratamento bem sucedido da EP, muitas vezes a nistatina é recomendada por períodos de até 15 dias, potencializando ainda mais os seus efeitos deletérios (HAWSER; ISLAM, 1999). Por fim, reforçando ainda mais a importância da associação do adesivo com os produtos testados, do ponto de vista clínico, vale a pena ressaltar que muitos pacientes geriátricos, dependentes de profissionais cuidadores, apresentam dificuldades e limitações consideráveis em administrar com periodicidade os medicamentos convencionais, incluindo os antifúngicos. Dentro deste contexto e remetendo aos efeitos colaterais da nistatina, parece promissora a associação dos adesivos com os fitoterápicos no tratamento e/ou prevenção da EP.

Segundo nossos achados, quanto à ação antimicrobiana, estes fitoterápicos podem ser considerados colaboradores efetivos dos adesivos protéticos. Pretendemos, então, sugerir que o COREGA®, se adicionado destes fitoterápicos na sua composição, possa constituir uma opção auxiliar dentre as abordagens terapêuticas e/ou preventivas para a EP, atuando sobre o principal fator etiológico, o fungo *C. albicans*, desde que testes mecânicos adicionais sejam realizados para descartar alterações em suas funções primordiais. Essa proposta de associação pode tornar-se, futuramente, um método inovador e alternativo no auxílio da prevenção e/ou tratamento da EP, amenizando um dos mais antigos e principais desconfortos dos cirurgiões-dentistas quando da recomendação dos adesivos para usuários de próteses totais removíveis: a contaminação microbiológica (EKSTRAND;

HENSTEN-PETTERSEN; KULLMANN, 1993; GATES; GOLDSCHIMIDT; KRAMER, 1994).

A ação antifúngica, observada neste trabalho, após adição dos fitoterápicos ao adesivo, manteve-se ao longo de 12 horas. Isto pode ser explicado, novamente, pela presença do PEG no COREGA®. Os PEGs possuem um grande número de átomos de oxigênio, os quais são capazes de formar fortes ligações de hidrogênio com os grupos fenólicos de taninos (MAKKAR, 2003). De fato, o PEG tem sido incorporado, com sucesso, em antifúngicos convencionais, como a anfotericina B e a nistatina, ou em óleos essenciais como o de cravo, canela e alho, atuando como carreador. A associação do PEG ou de produtos contendo PEG com compostos que possuem atividade antimicrobiana vem sendo considerada uma alternativa promissora para auxiliar no tratamento de infecções causadas por *C. albicans*, *S. aureus* ou *Campylobacter jejun* (LLABOT et al., 2007a; LLABOT et al., 2007b; HALPERIN et al. 2016; AHMED; HIREMATH; JACOB, 2016).

Em virtude desses achados, acreditamos que o PEG, presente no COREGA®, atuou como um bom carreador para ambos os fitoterápicos (*E. giganteum* e *P. granatum*), quando incorporados ao adesivo, permitindo que a interferência sobre o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* tenha permanecido ao longo do tempo experimental. Vislumbrando encontrar uma nova opção que auxilie no tratamento/prevenção da EP, a permanência deste benefício antifúngico pelo maior tempo possível fortalece a importância desta associação como uma alternativa viável e eficaz.

Nossos resultados revelaram também que a quantificação do biofilme sobre a superfície da resina acrílica, independente do tratamento prévio, foi crescente com o passar do tempo de indução do biofilme, demonstrando aumento de células viáveis de *C. albicans* no período mais tardio (12 horas) em relação ao inicial (3 horas). De fato, fungos *C. albicans* possuem potencial inerente de formar biofilmes quantitativamente significativos (KUHN et al., 2002a; KUHN et al., 2002b), como evidenciado por nós no grupo sem tratamento (**PBS**). No caso dos grupos correspondentes aos tratamentos da resina com adesivos, deve ser considerado o aumento da solubilidade dos adesivos protéticos ao longo do tempo (PAPADIOCHOU; EMMANOUIL; PAPADIOCHOS, 2015).

Assim, podemos sugerir que, em nosso modelo experimental, o COREGA®, associado ou não aos fitoterápicos, diluiu no meio de cultura com o

passar do tempo, perdendo, em parte, sua efetividade frente ao desenvolvimento das células de *C. albicans*. Por esta razão, o efeito antimicrobiano das associações **AD/Eg** e **AD/Pg**, propostas neste trabalho, deve ser considerado temporário frente ao biofilme fúngico desenvolvido sobre a superfície interna das próteses removíveis. Isto não nos parece uma desvantagem, visto que os adesivos, na forma de creme ou de pó, alcançam a eficácia do potencial de adesão após as primeiras 2/4 horas de aplicação (GRASSO, RENDELL, GAY, 1994); passadas 6 horas de uso, perdem cerca de 30 a 50% da sua eficácia, sendo removidos pela saliva (CHEW, 1990; GHANI; PICTON, 1994; KULAK; OZCAN; ARIKAN, 2005; KORONIS, 2012; VAN'T-HOF et al., 2014). Em especial, para o COREGA®, o tempo máximo de uso, segundo o fabricante, não deve ultrapassar 12 horas, necessitando ser reaplicado quando se deseja manter a função do material (informações contidas na embalagem do produto/ lote TA0082V).

Associando-se positivamente com estas afirmações, os melhores resultados em relação à inibição do crescimento fúngico pelos fitoterápicos foram observados, neste trabalho, no período inicial (3 horas) de indução do biofilme de *C. albicans*.

Por fim, de acordo com nossos achados, torna-se promissora a ideia de avançar nossa investigação incluindo estudos in vivo e, posteriormente, clínicos, objetivando a aplicação do adesivo protético (uma ferramenta para obtenção da estabilidade e melhoria da capacidade mastigatória de pacientes edêntulos) associado aos fitoterápicos *E. giganteum* ou *P. granatum*, sobre as próteses totais removíveis. Além da função primordial de estabilidade e retenção obtida pelos adesivos protéticos, tal associação atuaria como um colaborador temporário no tratamento/prevenção da EP, incluindo situações de reinfecção por *C. albicans*. Porém, vale ressaltar que tal associação é capaz de minimizar a colonização de *C. albicans* na superfície da resina acrílica termopolimerizável, mas não elimina o biofilme fúngico na sua totalidade.

Entretanto, estudos adicionais deverão ser realizados para verificar se esta associação, proposta pela nossa equipe, não alterará as propriedades inerentes do adesivo em questão (COREGA®), como por exemplo solubilidade, viscosidade e potencial de adesão, além das características ideais como insipidez e cor.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Em suma, com base nas metodologias aplicadas, a partir dos resultados obtidos e considerando o modelo experimental *in vitro*, podemos constatar que:

1. A análise fitoquímica dos extratos e das frações escolhidas demonstrou a presença de flavonoides em *E. giganteum* e taninos em *P. granatum*, sendo os possíveis compostos responsáveis pela ação antimicrobiana observada nestas plantas;
2. *E. giganteum* e *P. granatum* influenciaram no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* sobre a superfície da resina acrílica termopolimerizável quando associados ao COREGA®, minimizando significativamente sua colonização e reduzindo seu metabolismo.

Sendo assim, sugerimos que *E. giganteum* e *P. granatum* associados ao adesivo protético COREGA® exercem papel colaborador e inovador, podendo auxiliar de forma temporária no tratamento e/ou prevenção da EP, atuando sobre o principal agente etiológico desta patologia, o fungo *C. albicans*. Desta forma, a associação de adesivos protéticos com fitoterápicos, aliada à correta higienização diária da prótese, poderá ser uma alternativa viável e menos deletéria que os fármacos convencionais, como a nistatina, desde que as propriedades inerentes do adesivo sejam mantidas.

Referências

REFERÊNCIAS

Adebamowo CA, Cho E, Sampson L, Katan MB, Spiegelman D, Willett WC, Holmes MD. Dietary flavonols and flavonol - rich foods intake and the risk of breast cancer. *Int. J.Cancer*. 2005;20(114):628-33.

Adisman IK. The use of denture adhesives as an aid to denture treatment. *J Prosthet Dent*. 1989;62:711-715.

Aguirre JM, Verdugo F, Zamacona JM, Quindos G, Ponton J. Cytological changes in oral mucosa in denture stomatitis. *Gerodontology*. 1996 Jul;13(1):63-7.

Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev*. 1996;16:111.

Ahmed J, Hiremath N, Jacob H. Antimicrobial, Rheological, and Thermal Properties of Plasticized Polylactide Films Incorporated with Essential Oils to Inhibit *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. *J Food Sci*. 2016 Feb;81(2):419-29.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):455-9.

Alavarce RAS. Fitoterápico *Equisetum giganteum* e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e anti-inflamatória contra *Candida albicans*, e potencial citotóxico sobre células epiteliais do palato humano [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2014.

Alavarce RA, Saldanha LL, Almeida NL, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. The Beneficial Effect of *Equisetum giganteum* L. against *Candida* Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2015.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J. Med. Microbiol*. 2006;55:999–1008.

Alibeik S, Zhu S, Brash JL. Surface modification with PEG and hirudin for protein resistance and thrombin neutralization in blood contact. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Dec 1;81(2):389-96.

Allegra F, Gennari PU. Doenças da mucosa bucal. 1 ed. São Paulo: Editora Santos; 2000.

Alves PM, Queiroz LM, Pereira JV, Pereira Mdo S. In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Mar-Apr;42(2):222-4.

Andersen OM, Markham KR. Flavonoides: chemistry, biochemistry and applications. New York: Taylor & Francis; 2006.

Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2005 Jul 14;99(3):325-48.

Andrade CA, Wiedenfeld H, Revilla MC, Sergio IA. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*. 2000;72:129-33.

Anibal PC, Peixoto IT, Foglio MA, Hoflihg JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. *Braz J Microbiol*. 2013;44(3):839-48.

American Dental Association. Accepted dental remedies: Chicago: American Dental Association, 1984;105.

Arantes AA, Prado J, Ranal MA. Licófitas e Samambaias da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, MG, Brasil: Equisetaceae, Lycopodiaceae e chave para as famílias. *Hoehnea*. 2010;37:107-15.

Ardrey RE. Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction. San Francisco: John Wiley & Sons; 2003.

Arend DP, dos Santos TC, Sonaglio D, Dos Santos AL, Reginatto FH, de Campos AM. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. J Pharm Biomed Anal. 2011 Jan 5;54(1):58-66.

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. J Oral Rehabil. 1987 May;14(3):217-27.

Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. Br Dent J. 1979 Nov 20;147(10):267-72.

Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. Am J Clin Nutr. 2000;71(5):1062-76.

Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. Atherosclerosis. 2001;158(1):195-8.

Awad MA, Feine JS. Measuring patient satisfaction with mandibular prostheses. Community Dent Oral Epidemiol. 1998;26:400-5.

Bakhshi M, Taheri JB, Shabestari SB, Tanik A, Pahlevan R. Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. Gerodontology. 2012;29:680-684.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. Food Chem Toxicol. 2008 Feb;46(2):446-75.

Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling*. 2013 Sep;29(8):929-37.

Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*. 1999 Jul;48(7):671-9.

Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Sep;46(3):397-403.

Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995 Mar;61(3):199-200, 203-5.

Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001;21(1):4-8.

Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(1):51-9.

Barbenel JC. Physical retention of complete dentures. *J Prosthet Dent*. 1971;76:592-600.

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 May;31(5):453-9.

-
- Baracho NC, Do Vale et al. Estudo da hepatotoxicidade aguda da *Equisetum arvense* L. em ratos. Escola de medicina de Itajubá, Minas Gerias. Acta Cirúrgica Brasileira. 2009; 24(6): 449–453.
- Bartels HA. Bacterial activity and tissue tolerance: their role in prosthodontia. J Dent Educ. 1944;9:57-72.
- Bartels HA. Bacteriological appraisals of adhesive denture powders. J Dent Res. 1945;24(1):15-6.
- Bartlett DW, Maggio B, Targett D, Fenlona MR, Thomas J. A preliminary investigation into the use of denture adhesives combined with dietary advice to improve diets in complete denture wearers. J Dent. 2013;41:143-7.
- Becchi M, Fraisse D. Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids. Biological Mass Spectrometry. 1989;18(2):122-130.
- Beckerta C, Horna C, Schnitzler JP, Lehning A, Heller W, Veit M. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. Biosynthesis. 1997 Jan;44(2):275–283.
- Bergendal T, Isacson G. Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. Scand J Dent Res. 1980;88(5):446-54.
- Bergendal B. The relative importance of tooth loss and denture wearing in Swedish adults. Community Dent Health. 1989;6:103–111.
- Bergström K, Holmberg K, Safranji A, Hoffman AS, Edgell MJ, Kozlowski A, Hovanes BA, Harris JM. Reduction of fibrinogen adsorption on PEG-coated polystyrene surfaces. J Biomed Mater Res. 1992 Jun;26(6):779-90.
- Bilhan H, Sulun T, Erkose G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O, Bilgin T. The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. Clin Oral Investig. 2009 Dec;13(4):363-8.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* 2008 May;8(3):442-50.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997 Jul;13(4):258-69.

Boone M. Analysis of soluble and insoluble denture adhesives and their relationship to tissue irritation and bone resorptiob. *Compend Contin Educ Dent.* 1984;4:22-5.

Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(1-2):335-9.

Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 May;31(5):472-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002–2003. Brasília; 2004.

Brunskole M, Zorko K, Kerbler V, Martens S, Stojan J, Gobec S, Lanisnik RT. Trihydroxynaphthalene reductase of *Curvularia lunata*-A target for flavonoid action. *Chem. Biol. Interact.* 2009; 178:259-67.

Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol Scand.* 1970 Mar;28(1):71-92.

Budtz-Jørgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974;82(2):151-90.

Budtz-Jorgensen E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. J Am Dent Assoc. 1978;96(3):474-9.

Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. Acta Odontol Scand. 1990 Feb;48(1):61-9.

Bueno MG, Urban VM, Barbério GS, da Silva WJ, Porto VC, Pinto L, Neppelenbroek KH. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. Oral Dis. 2015; 21:57-65.

Bunetel L, Bonnaure-Mallet M. Oral pathoses caused by *Candida albicans* during chemotherapy: update on development mechanisms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996 Aug;82(2):161-5.

Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. Mini Rev Med Chem. 2011 Apr;11(4):298-344.

Campagnoli EB, Sandrin R, Durscki J, Grégio AMT, Lima AAS. Candidose, qual o melhor tratamento? Bras Clin OdontolInteg. 2004;8(43):72-6.

Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. J Dent Educ. 2001 Aug;65(8):785-7.

Carson CF, Riley TV. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. Commun Dis Intell Q Rep. 2003;27:143-6.

-
- Carter GM, Kerr MA, Shepherd MG. The rational management of oral candidosis associated with dentures. *N Z Dent J*. 1986 Jul;82(369):81-4.
- Casaroto AR, Lara V. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. *Fitoterapia*. 2010;81:323-328.
- Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105:327-32.
- Catão RMR, Antunes RMO, Arruda TA, Pereira MSV, Higino JS, Alves JA, Passos MGVM, Santos VL. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Anal Clin*. 2006;38:111-114.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol*. 2001a;183(18):5385-94.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001b Mar;80(3):903-8.
- Chew CL. Retention of denture adhesives - an in vitro study. *J Oral Rehabil*. 1990 Sep;17(5):425-34.
- Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1995 Sep;74(3):309-13.
- Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):377-83.

Corega: pó fixador de dentaduras. Milton de Oliveira. Rio de Janeiro: GlaxoSmithkline Brasil Ltda., 2013. Bula de Remédio.

Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame M Jr, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. Arch Oral Biol. 2011 Nov;56(11):1299-305.

Costa AC, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AO. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. Mycoses. 2013 Nov;56(6):614-22.

Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. Br J Biomed Sci. 2007;64(4):180-9.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999 Oct;12(4):564-82.

Cushnie, T.P. and Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J Antimicrob. Agents. 2005; 26:343-56.

Cuyckens F. et al. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. Analysis. 2000;28(10):888-895.

Cuyckens F, Claeys M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2002;16(24):2341-2348.

Dantas SAF, Sena LVT, Melo DJA, Duarte FT, Carvalho. Avaliação de Plantas Medicinais no combate a Mastite Bovina. Holos. 2001;4(97):96-102.

Da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Saramanayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. Braz Dent J. 2008;19(4):364-9.

Da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Jul;94(1):149-56.

Da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, Porto VC. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. Mycoses. 2011 Nov;54(6):e712-7.

Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. Br Dent J. 1970 Aug 18;129(4):151-6.

Davenport JC. The denture surface. Br Dent J. 1972 Aug 1;133(3):101-5.

Davey ME, O'toole G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000;64:847-67.

De Carvalho PB, Ferreira EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. Fitoterapia. 2001;72(6):599-618.

Descotes J, et al. Responses of the immune system to injury. Toxicol. Pathol. 2000;28:479-481.

De Vries JH, Janssen PL, Hollman PC, Van Staveren WA, Katan M.B. Consumption of quercetin and kaempferol in freelifving subjects eating a variety of diets. *Cancer Lett.* 1997;19:141-4.

Dhale RP, Ghorpade MV, Dharmadhikari CA. Comparison of various methods used to detect biofilm production of *Candida* species. *J ClinDiagn Res.* 2014 Nov;8(11):18-20.

Djipa CD, Delmée M, Quetin-Leclercq J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) alston (Myrtaceae). *J Ethnopharmacol.* 2000 Jul;71(1-2):307-13.

Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res.* 2005 Nov;84(11):966-77.

Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2001 Oct 15;33(8):1387-92.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167-93.

Douglass CW, Shih A, Ostry L. Will there be a need for complete dentures in the United States in 2020? *J Prosthet Dent.* 2002;87:5-8.

Ekstrand K, Hensten-Pettersen A, Kullmann A. Denture adhesives: cytotoxicity, microbial contamination, and formaldehyde content. *J Prosthet Dent.* 1993 Mar;69(3):314-7.

Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman RB. Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5771-7.

Ellepola AN, Saramanayake LP. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch Oral Biol*. 1998;43(12):999-1007.

Ellis B, Al-Nakash S, Lamb DJ. The composition and rheology of denture adhesives. *J Dent*. 1980;8:109-18.

Ellse L, Wall R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. *Med Vet Entomol*. 2014 Sep;28(3):233-43.

Endo EH, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol*. 2010;161(7):534-4.

Endo EH, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Filho BP. Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*. *Molecules*. 2012 Aug 24;17(9):10094-107.

Ernst C, Angst J. Depression in old age. Is there a real decrease in prevalence? A review. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1995;245(6):272-87.

Ernst E. Herbal remedies for anxiety; a systematic review of controlled clinical trials. *Phytomedicine*. 2006;13:205–208.

Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods*. 2011; 86(2):238-42.

European Commite For Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical, M,; Infectious, D. Eucast. Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobials agents by agar dilution. Clin Microbial Infect. 2000;6(9):509-15.

Felton DA. Edentulism and comorbid factors. J Prosthodont. 2009;18:88-96.

Fetrow CW, Avila JR. Manual de medicina alternativa para o profissional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 590-92.

Ferencz JL, Felton DA. Facing the future of edentulism. J Prosthodont. 2009;18:86-7.

Ferraz M, Pereira A, Lopes M, Fernandes M. Avaliação das Possibilidades de aplicação na regeneração Óssea. Universidade Fernando Pessoa. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. 2008;5:136-145

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. J Oral Rehabil. 2007 Jun;34(6):448-55.

Folse GJ. Denture adhesives: when, why, and how. Dent Today. 2004;23:70-1.

Fonseca FA, Jones KM, Mesnded DC, Dos Santos Neto PE, Ferreira SC, Pordeus IA, et al. The oral health of seniors in Brazil: addressing the consequences of a historic lack of a public health dentistry in a unequal society. Gerodontology. 2013 Mar 14;8(1):56-9.

Galloway T, Handy R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. Ecotoxicology. 2003 Feb-Aug;12(1-4):345-63.

García-Villalba R, Espín JC, Aaby K, Alasalvar C, Heinonen M, Jacobs G, Voorspoels S, Koivumäki T, Kroon PA, Pelvan E, Saha S, Tomás-Barberán FA. Validated Method for the Characterization and Quantification of Extractable and Nonextractable Ellagitannins after Acid Hydrolysis in Pomegranate Fruits, Juices, and Extracts. J Agric Food Chem. 2015;63(29):6555-66.

Gardiner P, Graham R, Legedza AT, Ahn AC, Eisenberg DM, Phillips RS. Factors associated with herbal therapy use by adults in the United States. *Altern Ther Health Med*. 2007 Mar-Apr;13(2):22-9.

Gates WD, Goldschmidt M, Kramer D. Microbial contamination in four commercially available denture adhesives. *J Prosthet Dent*. 1994 Feb;71(2):154-8.

Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De VI, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer*. 2007;121:2225-32.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011 Jun;20(4):251-60.

Ghani F, Picton DC, Likeman P R. Some factors affecting retention forces with the use of denture fixatives on vivo. *BDJ*. 1991;171:15-21.

Ghani F, Picton DC. Some clinical investigations on retention forces of maxillary complete dentures with the use of denture fixatives. *J Oral Rehabil*. 1994 Nov;21(6):631-40.

Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res*. 1997;11:160–67.

Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol Gen Genet*. 1984;198(2):179-82.

Gracious Ross R, Selvasubramanian S, Jayasundar S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits--a preliminary study. *J Ethnopharmacol*. 2001;78(1):85-7.

Graefe EU, Veit M. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine*. 1999;6:239–46.

Grasso JE, Rendell J, Gay T. Effect of denture adhesive on the retention and stability of maxillary dentures. *J Prosthet Dent*. 1994;72:399-405.

Grasso JE. Denture adhesives: changing attitudes. *J Am Dent Assoc*. 1996; 127:90–6.

Grasso J. Effect of denture adhesive on retention of the mandibular and maxillary dentures during function. *J Clin Dent*. 2000;11:98-103.

Grasso JE. Denture adhesives. *Dent Clin N Am*. 2004;48:721–733.

Goldman E, Green LH. Practical handbook of microbiology. 2. ed. CRC Press, Boca Raton; 2008.

Goyal S, Gupta N, Chatterjee S. Investigating Therapeutic Potential of *Trigonella foenum graecum* L. as Our Defense Mechanism against Several Human Diseases. *J Toxicol*. 2016.

Habash M, Reid G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *J Clin Pharmacol*. 1999;39(9):887-98.

Habash MB, Van der Mei HC, Busscher HJ, Reid G. The effect of water, ascorbic acid, and cranberry derived supplementation on human urine and uropathogen adhesion to silicone rubber. *Can J Microbiol*. 1999 Aug;45(8):691-4.

Halperin A, Shadkchan Y, Pisarevsky E, Szpilman AM, Sandovsky H, Osherov N, Benhar I. Novel Water-Soluble Amphotericin B-PEG Conjugates with Low Toxicity and Potent in Vivo Efficacy. *J Med Chem*. 2016 Feb 11;59(3):1197-206.

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.

Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000;55:481-504.

Harnly MJ, Lin LZ. A screening method for the identifications of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plants materials. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 2007;55:1084-1096.

Harvey AL. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today*. 2000;5(7):294-300.

Harvey AL, Waterman PG. The continuing contribution of biodiversity to drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev*. 1998;1:71–76.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod*. 1996;59:205-215.

Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*. 1994 Mar;62(3):915-21.

Hawser S. Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTT formazan determinations. *J. Med. Vet. Mycol*. 1996;34:407–410.

Hawser SP. Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent *Candida albicans* to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronized *C. albicans* cells. J Med Vet Mycol. 1996;34(2):2128-31.

Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannoum MA. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. J. Clin. Microbiol. 1998;36:1450–1452.

Hawser S, Islam K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 1999 Mar;43(3):411-3.

Hawser SP, Jessup C, Vitullo J, Ghannoum MA. Utility of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyl-amino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) and minimum effective concentration assays in the determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to the lipopeptide class compounds. J Clin Microbiol. 2001 Jul;39(7):2738-41.

He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. Mycoses. 2006 Mar;49(2):80-4.

Heydecke G, Locker D, Awad MA, Lund JP, Feine JS. Oral and general health related quality of life with conventional and implant dentures. Community Dent Oral Epidemiol. 2003;31:161-8.

Hosegawa S, Toshiaki S, Hayakawa I. Effect of denture adhesive on stability of complete dentures and the masticatory function. J Med Dent Sci. 2003;50:239-47.

Howland RD, Maycek MJ, Harvey RA, Champe PC. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. 3rd ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.333-44.

Huang F, Wu W. Antidiabetic effect of a new peptide from *Squalus mitsukurii* liver (S-8300) in alloxan-diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32:521-25.

Hwang EI, Ahn BT, Lee HB, Kim YK, Lee KS, Bok SH, Kim YT, Kim SU. Inhibitory activity for chitin synthase II from *Saccharomyces cerevisiae* by tannins and related compounds. *Planta Med*. 2001;67:501-4.

Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc*. 1992;123(1):46-51.

International Standard Organization. Specification 1567: denture bases polymers. 2nd ed Switzerland: ISO,1998.

Jacobina M. Formação do biofilme de *Candida albicans* na superfície de uma resina acrílica termopolimerizável tratada com polímero líquido [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2012.

Jacobson MJ, Steckelberg KE, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. In vitro activity of micafungin against planktonic and sessile *Candida albicans* isolates. *Antimicrob AgentsChemother*. 2009;53:2638–9.

Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis - a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J*. 1992 Apr;37(2):107-14.

Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J ClinMicrobiol*. 2003 Jul;41(7):2961-7.

-
- Jorge AOC, Batista JA, Rego MA. Influência da xerostomia na transmissibilidade de *Candida albicans* na cavidade bucal de ratos. Rev Odontol UNICID 2000;12:121-8.
- Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. Altern Med Rev. 2008;13(2):128-44.
- Kayser O, Kirderlen AF, Brun R. In vitro activity of aurones against *Plasmodium falciparum* strains K1 and NF54. Planta Med. 2001;67(8):718-21.
- Kelly J, Kutscher AH, Tuoti F. Bacteriological studies with a new adhesive preparation for oral use. J Conn State Dent Assoc. 1959;33(3):9-14.
- Kerridge D, Nicholas RO. Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*. J Antimicrob Chemother. 1986 Oct;18:39-49.
- Kim E, Driscoll CF, Minah GE. The effect of a denture adhesive on the colonization of *Candida* species in vivo. J Prosthodont. 2003;12:187–191.
- Kimber I, Dearman RJ. Factors affecting the development of food allergy. Proc Nutr Soc. 2002a;61:435-9.
- Kimber BI, Dearman RJ. Immune response: adverse versus non-adverse effects. Toxicol. Pathol. 2002b;30:54-58.
- Kloucek P, Polesny ZB, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District (Short communication). Journal of Ethnopharmacology. 2005;99:309–12.
- Kolecka A, Krauke Y, Bujdakova H, Sychrova H. Subinhibitory concentrations of fluconazole increase the intracellular sodium content in both fluconazole-resistant and sensitive *Candida albicans* strains. Can J Microbiol. 2009 May;55(5):605-10.

Koreg R. Experimental and spontaneous diabetes mellitus in the rat and mouse. Kosice: Center of University P.J. Safarik. 1991;2:151-54.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GM, Murata RM, Yatsuda R, et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *Streptococci mutans*. Curr Microbiol. 2000a; 41(3):192-6.

Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000b;45(2):141-8.

Koronis S, Pizatos E, Polyzois G, Lagouvardos P. Clinical evaluation of three denture cushion adhesives by complete denture wearers. Gerodontology 2012;29:161-9.

Krishan K. A clinical evaluation of denture adhesive. J Dent. 1967;6:550-8.

Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdáková H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. J Med Microbiol. 2011 Sep;60(Pt 9):1261-9.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect Immun 2002a;70(2):878–88.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrob Agents Chemother 2002b;46(6): 1773–80

Kulak Y, Ozcan M, Arikan A. Subjective assessment by patients of the efficiency of two denture adhesive pastes. *J Prosthodont*. 2005;14:248-52.

Kunh DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):506-8.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Dec;5(6):608-11.

Kumar M, Thombare R.U. A comparative analysis of the effect of various denture adhesives available in market on the retentive ability of the maxillary denture: An in vivo study. *J Indian prosthodontsoc*. 2011;11(2):82-8.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*. 2013 Dec 29;2013:162750.

Labsi M, Khelifi L, Mezioug D, Soufli I, Touil-Boukoffa C. Antihydatic and immunomodulatory effects of *Punica granatum* peel aqueous extract in a murine model of echinococcosis. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Mar;9(3):211-20.

Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Design of novel antifungal mucoadhesive films Part I. Pre-formulation studies. *Int J Pharm*. 2007a Feb 7;330(1-2):54-60.

Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm*. 2007b May 24;336(2):263-8.

Lindstrom RE, Pawelchak J, Heyd A, Tarbert WJ. Physical-chemical aspects of denture retention and stability: a review of the literature. *J Prosthet Dent*. 1979;42:371-5.

Little JW, Falace DN. Dental management of medically compromised patients. 7th ed. Philadelphia. St. Louis: Mosby; 2000.

Liu RH. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. Adv Nutr. 2013;4(3):384-92.

Lombardi T, Budtz-Jørgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. Eur J Prosthodont Restor Dent. 1993 Sep;2(1):17-22.

Luster, MI & Rosenthal, GJ. Chemical agents and the immune response. Environ. Health Perspect. 1993;100:219-236.

Makihira S, Nikawa H, Satonobu SV et al. Growth of *Candida* species on commercial denture adhesives in vitro. Int J Prosthodont. 2001;14:48–52.

Makkar HPS. Effect and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research. 2003;49:241-256.

Mähönen K, Virtanen K, Larmas M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. J Oral Rehabil. 1998 Apr;25(4):304-10.

Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, MomenBeitollahi J, Shamshiri AR. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. J Mycol Med. 2014 Dec;24(4):163-8.

Marchini L, Montenegro FLB, Cunha VPP, Santos JFF. Prótese dentária na terceira idade. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2000;55(2):83-7.

Marriot MM, Noveer MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:3914-922.

Martins DMFH, Santos JG, Russi M, Lanziotti VMNB, Leal LKAM, Cunha GMA. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacol Res*. 2004;49:239–43.

Martori E, Ayuso-Montero R, Martinez-Gomis J, Viñas M, Peraire M. Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population. *J Prosthet Dent*. 2014 Apr;111(4):273-9.

Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. *Photomed Laser Surg*. 2005 Jun;23(3):328-32.

Meletiadiis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Donnelly PJ, Verweij PE; EUROFUNG Network. Comparison of spectrophotometric and visual readings of NCCLS method and evaluation of a colorimetric method based on reduction of a soluble tetrazolium salt, 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide], for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2001 Dec;39(12):4256-63.

Melo ASA, Colombo L, Arthington-Skaggs BA. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007;51:3081–3088.

Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, Pavarina AC. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Oct;18(10):380-8.

Munari CC, Alves JM, Bastos JK, Tavares DC. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharisdrá cunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. J Appl Toxicol. 2010;30(1);22-8.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003 Sep;67(3):400-28.

Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. Microbiology. 2008 Nov;154(11):3266-80.

Naqvi SAH, Khan MSY, Vohora SB. Antibacterial, antifungal and antihelmintic investigations on Indian medical plants. Rev Fitoterapia 1991;62:221–28.

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 Feb;93(2):171-6.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. J Oral Rehabil. 2008 Nov;35(11):836-46.

Nett JE, et al. Putative role of -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 2007;51:510–520.

Nett JE, Guite KM, Ringeisen A, Holoyda KA, Andes DR. Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 2008;52:3411–3413.

Nett JE, Crawford EK, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54:3505–3508.

Nett JE, Cain MT, Crawford K, Andes DR. Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. *J Clin Microbiol.* 2011 Apr;49(4):1426-33.

Neville B, Damm DD, Allen CM, Bouguot JE. *Oral & Maxillofacial Pathology*, 3rd edn. Philadelphia: WB Saunders. 2009:192–197.

Newall CA, Anderson LA, Phillipson J. D. *Plantas Medicinais para profissionais de saúde*. Premier, 2002.

Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. *British Dental Journal.* 1962;112:357-360.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent.* 1998 May;26(4):299-304.

Oliveira MC, Oliveira VM, Vieira AC et al. In vivo assessment of the effect of an adhesive for complete dentures on colonisation of *Candida* species. *Gerodontology.* 2010; 27:303–307.

Ozcan M, Kulak Y, de Baat C, Arikan A, Ucankale M. The effect of a new denture adhesive on bite force until denture dislodgement. *J Prosthodont.* 2005;14:122-126.

Ozcelik B, Orhan I, Toker G. Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. *Z. Naturforsch.* 2006;61:632-8.

Paiva LCA, Ribeiro RA, Pereira JV, Oliveira NMC. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 19(2):423-8.

Park KD, Kim YS, Han DK, Kim YH, Lee EH, Suh H, Choi KS. Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. *Biomaterials*. 1998 Apr-May;19(7-9):851-9.

Papadiochou S, Emmanouil I, Papadiochos I. Denture adhesives: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2015 May;113(5):391-397.

Parahitiyawa NB, Samaranayake YH, Samaranayake LP, Ye J, Tsang PW, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the *Calgary* biofilm device. *APMIS*. 2006 Apr;114(4):298-306.

Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*. 1997;89:39–46.

Patton LL, Bonito AJ, Shugars DA. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Aug;92(2):170-9.

Pavan S, dos Santos PH, Filho JN, Spolidorio DM. Colonisation of soft lining materials by micro-organisms. *Gerodontology*. 2010 Sep;27(3):211-6.

Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Guinesi AS, Vergani CE, Machado AL, Giampaolo ET. Effect of microwave disinfection on the flexural strength of hard chairside reline resins. *J Dent*. 2005 Oct;33(9):741-8.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nature Reviews*. 2010;8:340-49.

Pharand C, Ackman ML, Jackevicius CA et al. Use of OTC and herbal products in patients with cardiovascular disease. *Ann Pharmacother*. 2003;37:899.

Piueзам G, de Lima KC. Factors associated with missing teeth in the Brazilian elderly institutionalised population. *Gerodontology*. 2013 Jun;30(2):141-9.

Pinto LDR. Efeito da desinfecção química sobre a microdureza e rugosidade superficial de resinas para base de dentaduras e resinas rígidas para reembasamento. Estudo Longitudinal [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

Peralta MA, da Silva MA, Ortega MG, Cabrera JL, Paraje MG. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine*. 2015 Oct 15;22(11):975-80.

Pereira JV. Atividade antimicrobiana do estrato hidroalcoólico da *P. granatum* Linn. sobre microrganismos formadores da placa bacteriana. Joao Pessoa. Federal University of Paraíba, Post-graduation in Dentistry, Thesis. 1998; 91. Langley P. Why a pomegranate? *BMJ*. 2000;321(7269):1153-4.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2011a May;26(3):341-8.

Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão Md, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med*. 2011b Mar;77(4):401-4.

Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. Int J Prosthodont. 2007 May-Jun;20(3):308-10.

Peres P, Kapur KK, Garrett NR. Studies of biological parameters for denture design. Part III: effects of occlusal adjustment, bone retention, and fit on masseter muscle activity and masticatory performance. J Prosthet Dent. 1985;53:69-73.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton W, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* - *Candida albicans* dual-species biofilms. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2010;59:493-503.

Pradies G, Sanz I, Evans O et al. Clinical study comparing the efficacy of two denture adhesives in complete denture patients. Int J Prosthodont. 2009; 22:361–367.

Prista LN. Tecnologia farmacêutica. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1995. 3v.

Polytois GL. An update on denture fixatives. Dent Update. 1983;579.

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.

Queiroz MVF. Atividade antifúngica de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. [Doutorado]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 1998.

Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol. 1995 Jan;22(1):1-14.

-
- Radulovic N, Stojanovic G, Palic R. Composition and Antimicrobial Activity of *Equisetum arvense* L. Essential Oil (Short communication). *Phytother. Res.* 2006;20:85-88.
- Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2001 Dec;18(4):163-70.
- Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jul;98(1):53-9.
- Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006 Nov;6(7):979-86.
- Ramage G, Zalewska A, Cameron DA, Sherry L, Murray C, Finnegan MB, Loewy ZG, Jagger DC. A comparative in vitro study of two denture cleaning techniques as an effective strategy for inhibiting *Candida albicans* biofilms on denture surfaces and reducing inflammation. *J Prosthodont.* 2012 Oct;21(7):516-22.
- Rawya S, Al-Dhaheiri, Douglas LJ. Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. *Journal of Medical Microbiology.* 2010;59:149–57.
- Rogers TJ, Balish E. Immunity to *Candida albicans*. *Microbiol Rev.* 1980 Dec;44(4):660-82.
- Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, López-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilme formation on denture material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(5):669-72.
- Reither W. Effect of adhesive powders on the fit and position of complete dentures. *Dent Abstr.* 1957;2:154.

Regner GG, Giancesini J, Von Borowski RG, Silveira F, Semedo JG, Ferraz AB, Willand E, Von Poser G, Allgayer M, Picada JN, Pereira P. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: a medicinal plant with antifungal activity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011;31(1):242-9.

Revilla MC, Andrade-Cetto A, Islas S, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. *J. Ethnopharmacol*. 2002;81:117-20.

Ricco RA, Agudelo I, Garcés M, Evelson P, Wagner ML, Gurni AA. Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2011;10(4):326-332.

Riet-Corrêa F, Riet-Corrêa G, e Schild A. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes eqüídeos. *Pesq. Vet. Bras*. 2002;22(4):161-168.

Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman. 158 U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2006;1112:31-63.

Rogers TR. Antifungal drug resistance: does it matter? *Int J Infect Dis*. 2002 Mar;6 Suppl 1:S47-53.

Rosa, JM. O segredo milenar da cura indígena através das ervas. *Erexim*. 2002.

Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri MP, Mallamaci R. *In vitro* synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine*. 2009;16:972–975.

Sakurai N, Iizuka T, Nakayama S, Funayama H, Noguchi M, Nagai M. Vasorelaxant activity of caffeic acid derivatives from *Cichorium intybus* and *Equisetum arvense*. *Yakugaku Zasshi*. 2003;123:593–598.

Saldanha LL. Prospecção química e avaliação das atividades e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. Dissertação [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu; 2013.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A, Petruzzi M, Serpico R. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1;16(2):139-43.

Sampaio-Maia B, Figueiral MH, Sousa-Rodrigues P, et al. The effect of denture adhesives on *Candida albicans* growth in vitro. *Gerodontology*. 2012;29:348–356.

Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol*. 1980;25(8-9):611-5.

Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinstein N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. *Clin Oral Investig*. 2007;11(2):143-7.

Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1318-26.

Sato Y, Kaiba Y, Hayakawa I. Evaluation of denture retention ease of removal from oral mucosa on a new gel-type denture adhesive. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi*. 2008;52:175-82.

Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991;30:3875-388.

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

Scher EA, Ritchie GM, Flowers DJ. Antimycotic denture adhesive in treatment of denture stomatitis. J Prosthet Dent. 1978;40:622-7.

Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J Ethnopharmacol. 1999;66(1):11-7.

Seneviratne CJ1, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. Arch Oral Biol. 2009; 54(11):1052-60.

Sesma N, Laganá DC, Morimoto S, Gil C. Effect of denture surface glazing on denture plaque formation. Braz Dent J. 2005;16(2):129-34.

Shah NB, Gounaris MC, Holeva KT, inventors; Richardson-Vicks, Inc, assignee. Denture stabilizing zinc and strontium salts of AVE/MA copolymer. US patent 4 758 630. July 19, 1988.

Sharma S, Hegde V. Comparative evaluation of antifungal activity of melaleuca oil and fluconazole when incorporated in tissue conditioner: an in vitro study. J Prosthodont. 2014 Jul;23(5):367-73.

Shay K. The retention of complete dentures. J Am Dent Assoc. 1991;122:70-6.

Shinde RB, Chauhan NM, Raut JS, Karuppaiyl SM. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012 Oct 4;11:27.

Silva CH, Paranhos HdeF, Ito IY. Biofilm disclosing agents in complete denture: clinical and antimicrobial evaluation. *Pesqui Odontol Bras*. 2002 Jul-Sep;16(3):270-5.

Silva MES, Vilaça EL, Magalhães CS, Ferreira EF. Impact of tooth loss in quality of life. *CSC*. 2010;15:841–850.

Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC method development*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons; 1997.

Sommer L. Isolation of an essential oil from *Equisetum*. *Farmacia*. 1961;9:75–81.

Somme L, Mintezer L, Rindasu G. Antimicrobial activity of the volatile oil extracted from *Equisetum arvense*. *Farmacia*. 1962;10: 535–41.

Srinivasan A, Uppuluri P, Lopez-Ribot J, Ramasubramanian AK. Development of a high-throughput *Candida albicans* biofilm chip. *PLoS One*. 2011 Apr 22;6(4):e19036.

Stafford GD. Denture adhesives - a review of their uses and composition. *Dent Practit*. 1970;21:17-9.

Stafford GD, Russell C. Efficiency of denture adhesives and their possible influence on oral microorganisms. *J Dent Res*. 1971;50:832–836.

Steele JG, Sanders AE, Slade GD, Allen PF, Lahti S, Nuttall N, et al. How do age and tooth loss affect oral health impacts and quality of life? A study comparing two national samples. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2004; 32:107-14.

Stefan G. The Optional European Code on the Basis of the Acquis Communautaire—Starting Point and Trends. *European Law Journal* 2004;10:698--711.

Stevens MG, Olsen SC. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. J Immunol Methods. 1993 Jan 4;157(1-2):225-31.

Sticher O. Natural product isolation. Natural Product Reports. 2008;25:517-554.

Taff HT, Nett JE, Andes DR, Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. Medical Mycology. Early Online. 2011;1–5.

Tarbet WJ, Grossman E. Observation of denture-supporting tissue during six months of denture adhesive wearing. JADA 1980;101:789-91.

Tarbet WJ, Boone M, Schmidt NF. Effect of a denture adhesive on complete denture dislodgement during mastication. J Prosthet Dent. 1980;44:374-8.

Tarbet WJ, Silverman G, Schmidt NF. Maximum incisal biting force in denture wearers as influenced by adequacy of denture-bearing tissue and use of an adhesive. J Dent Res. 1981;60:115-9.

Taylor R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. JDMS. 1970;1:35-39.

Tellier R, Krajden M, Grigoriew GA, Campbell I. Innovative endpoint determinatins system for antifungal for susceptibility testing of yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 1992;36(8):1619-25.

Tepe B, Daferera D, Sokme M, Polissiou M, Sokemen A. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M Zohary et P.H. Davis. J Agric Food Chem. 2004; 52:1132–37.

Tezvergil-Mutluay A, Carvalho RM, Pashley DH. Hyperzincemia from ingestion of denture adhesives. J Prosthet Dent. 2010 Jun;103(6):380-3.

Thorstensson H, Johansson B. Why do some people lose teeth across their lifespan whereas others retain a functional dentition into very old age? *Gerodontology*. 2010 Mar;27(1):19-25.

Tobudic S, Lassnigg A, Kratzer C, Graninger W, Presterl E. Antifungal activity of amphotericin B, caspofungin and posaconazole on *Candida albicans* biofilms in intermediate and mature development phases. *Mycoses*. 2010 May;53(3):208-14.

Tommy W, Hames W. *Dental Drug Consultation*, 5th edn. USA: Mosby; 2007. p. 296–9.

Trouillas P, Calliste, CA, Allais, DP, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem*. 2003;80:399–407.

Tunnet MM, Gorman SP, Patrick S. Infection associated with medical devices. *Rev Med Microbiol*. 1996;7:195-205.

Uludamar A, Özyeşil AG, Ozkan YK. Clinical and microbiological efficacy of three different treatment methods in the management of denture stomatitis. *Gerodontology*. 2011 Jun;28(2):104-10.

Uppuluri P, Nett, J. Heitman, and D. Andes. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008;52:1127–32.

Uysal H, Altay OT, Alparslan N, Bilge A. Comparison of four different denture cushion adhesives — a subjective study. *J Oral Rehabil*. 1998;25:209-13.

Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *J Dent*. 2013 May;41(5):420-7.

Valle R, Godoy R.L, Garcia O, Pradies G. Adhesivos para prótesis completas: situación actual. RCOE. 2007;12(4):273-82.

Van 't Hof W, Veerman ECI, NieuwAmerongen AV, Ligtenberg AJM, Veerman ECI. Saliva: secretion and functions. Basel Karger; 2014; 40-51.

Vasconcelos LC, Sampaio MC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. Mycoses. 2003;46(5-6):192-6.

Vasconcelos LC, Sampaio FC, Sampaio MC, Pereira Mdo S, Higino JS, Peixoto MH. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. Braz Dent J. 2006; 17(3):223-7.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. Aust Dent J. 1998a Aug;43(4):244-9.

Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. J Oral Rehabil. 1998b Jun;25(6):416-23.

Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. Gerodontology. 2005 Sep;22(3):168-76.

Weber JC, Lamb DR. Statistics and Research in Physical Education. St. Louis: CV Mosby Co. 1970;222:59-64.

Weidner-Strshl SK. Multicenter clinical study of indications for use of denture adhesives. Quintessence. 1984; 35:1547- 51.

Xu LC, Siedlecki CA. Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation. ActaBiomater. 2012 Jan;8(1):72-81.

Xu LC, Siedlecki CA. *Staphylococcus epidermidis* adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. Biomed Mater. 2014 Jun;9(3):035003.

Xu LC, Siedlecki CA. Protein adsorption, platelet adhesion, and bacterial adhesion to polyethylene-glycol-textured polyurethane biomaterial surfaces. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015;6(4):564-70.

Yankel SL. Overview of research and literature on denture adhesives. Compend Contin Educ Dent. 1984;4:518–21.

Yordanov M, Dimitrova P, Patkar S, Saso L, Ivanovska N. Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. Can. J. Microbiol. 2008;54:435-40.

Zhou Y, Li Y, Zhou T, Zheng J, Li S, Li HB. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. Nutrients. 2016 Mar 10;8(3)156.