UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

RÔMULO ROCHA REGIS

Análise das propriedades biológicas de um monômero
antimicrobiano para aplicação em prótese dentária

Ribeirão Preto

2009

RÔMULO ROCHA REGIS

Análise das propriedades biológicas de um monômero
antimicrobiano para aplicação em prótese dentária

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Reabilitação Oral, junto ao Departamento de
Materiais Dentários e Prótese.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza

Ribeirão Preto
2009

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Regis, Rômulo Rocha

Análise das propriedades biológicas de um monômero antimicrobial para aplicação em prótese dentária. Ribeirão Preto, 2009.

123 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Souza, Raphael Freitas de.

1. resinas acrílicas.
2. bases de dentadura.
3. *Candida*.
4. compostos de amônio quaternário.
5. estomatite sob prótese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rômulo Rocha Regis

Análise das propriedades biológicas de um monômero antimicrobiano para aplicação em prótese dentária.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre, junto ao Departamento de Materiais Dentários e Prótese.
Área de Concentração: Reabilitação Oral

Data da defesa: 11/01/2010

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A **Deus**, autor e consumidor da minha fé, que me ama incondicionalmente e nunca tirou de mim seu olhar de amor e compaixão. A quem devo tudo o que sou, tudo o que tenho e tudo o que virei a ser. Àquele que sempre me recebeu de braços abertos como um Pai que diariamente espera o retorno do filho distante.

Aos meus queridos e amados pais, **Fátima** e **Josias**, que estiveram comigo não somente desde o dia em que compartilhei o desejo de deixar seus lares para vir fazer minha pós-graduação, mas por toda a minha vida. Seu apoio e cuidado constantes, amor incondicional, perdão, força. Por suas palavras de encorajamento, pelo suprimento afetivo e material, enfim, pela alegria que representam para mim e por terem sonhado tudo isso comigo.

À minha irmã **Josiane**, pela companhia e vida que compartilhou comigo por toda minha vida. Sinto sua falta desde o dia que deixei de conviver com você diariamente. Você nunca saberá de todas as lágrimas que derramei e saudades que senti de você.

Às minhas irmãs **Carol, Laura e Lara**. Tão pequenas, mas ocupam um lugar tão grande no meu coração. Certamente ainda não compreendem o porquê de eu não estar acompanhando seu crescimento de perto, mas sentem a alegria do meu coração em cada abraço, sorriso e brincadeira durante os períodos de férias.

À minha namorada **Priscila**, minha artista, minha sonhadora, por sua compreensão, por seu toque artístico na formatação desta dissertação, bem como em todos os painéis apresentados em congressos. Não só por isso, mas por sua arte em minha vida, por me ajudar a ver a vida de uma forma tão mais interessante e por ter me ensinado a aproveitá-la ... e a sonhar.

A todos os meus familiares que, do seu jeito, acreditam e torcem por mim.

Dedico este trabalho

Agradecimento Especial

Ao meu amigo, orientador, **Profº. Dr. Raphael Freitas de Souza**, a quem devo esse trabalho e cada oportunidade de crescer na minha carreira acadêmica. Agradeço por toda confiança, ajuda e orientação ao longo desse processo, o qual apenas começou. Não só por isso, mas por ter me recebido em sua casa, quando cheguei aqui, mesmo sem me conhecer. Agradeço também por seu encorajamento e direção. Você me fez ver que fé e ciência, sim, podem andar juntas.

Muito obrigado.

Agradecimentos

Não me sentirei preocupado ou triste pela possibilidade de não citar alguns nomes importantes aqui, mas imensamente privilegiado por saber ser impossível citar todos eles nesse espaço restrito. Sou muito grato por ter muitas pessoas contribuindo não somente nesse trabalho, mas em toda a minha vida. Próximos e distantes. Brasileiros e estrangeiros. Colegas e amigos.

À **Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva**, por sua amizade, por todo apoio, encorajamento, solicitude quando precisei e por todos os casos difíceis que você me ajudou a solucionar na clínica.

À **Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos**, por toda a ajuda na escrita deste trabalho e oportunidades de crescer dentro desta instituição. Obrigado palavras ditas a meu respeito durante minha entrevista de seleção para o doutorado. Nunca me esquecerei delas.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo**, FAPESP, pelo financiamento na realização dessa pesquisa, por meio dos processos nº 2007/53347-7 (bolsa de mestrado) e 2007/05245-0 (auxílio à pesquisa).

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, FORP-USP, representada pelo Diretor **Prof. Dr. Luiz Osvaldo Bezzon**, por ter me acolhido e aberto inúmeras portas para a realização deste trabalho e de vários outros.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, **Profa. Dra. Iara Augusta Orsi**, por acreditar em mim. Também agradeço palavras ditas a meu respeito durante minha entrevista de seleção para o doutorado.

Aos **professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, DMDP da FORP-USP, por toda a contribuição dada para minha formação como Mestre.

Às funcionárias da FORP-USP, **Regiane Tirado, Ana Paula Xavier, Regiane Moi e Isabel Sola**, por tornarem a burocracia menos chata e fazerem o “sistema” funcionar.

Aos **técnicos** do DMDP da FORP-USP, por toda a disponibilidade em ensinar e realizar alguns testes apresentados neste trabalho.

Ao **Profº. Dr. Antônio Carlos Pizzolito**, pela ajuda inestimável com os primeiros testes microbiológicos realizados e pela cessão de seu laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, para a realização dos mesmos, antes que o laboratório de microbiologia do DMDP/FORP-USP estivesse em condições de uso.

A **Profª. Dra. Isabel Yoko Ito** por ceder as cepas para a realização dos testes microbiológicos.

Ao **Prof. Dr. Adhemar Colla Ruvolo Filho**, pela ajuda científica e síntese inicial do monômero antimicrobiano apresentado neste trabalho.

Aos **laboratórios do Departamento de Físico-Química da Universidade Federal de São Carlos**, pelo espaço cedido para a síntese inicial do monômero antimicrobiano apresentado neste trabalho.

Aos **Profºs. Drs. Claudio Miguel da Costa Neto e Pedro Paulo Chaves de Souza**, pela ajuda com a realização dos testes de citotoxicidade apresentados neste trabalho, dentro do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao **Prof. Dr. Evandro Watanabe** pelos esclarecimentos em alguns procedimentos microbiológicos.

A todos os **pacientes** que reabilitei nas práticas clínicas, pela sua confiança, compreensão, bem como pelos presentinhos.

Aos queridos **colegas e amigos de pós-graduação** que conquistei ao longo deste tempo e que tornaram este processo mais agradável e divertido. Obrigado por me enriquecer com seus conhecimentos e experiências.

À amiga e companheira **Cristiane Tomaz Rocha**, por toda ajuda e companheirismo, e me fazer sentir mais perto da terrinha.

Aos amigos **Humberto Oliveira, Alessandra Azevedo e Letícia Davi**, pelo companheirismo, ajuda e encorajamento, pelas risadas e trocas de experiências.

Às amigas de turma e parceiras de luta **Ana Paula Godoi e Lariça Raimundo**, por todas as vezes que me acolheram sob seu teto e que me motivaram a completar minhas tarefas da pós-graduação.

Aos amigos **Paulo Faria e Daniella Felipucci**, pela confiança e oportunidades dadas para iniciar minha prática clínica na implantodontia e próteses sobre implantes.

Ao querido amigo **Osmar Soares**, pela revisão do português e por tornar esse processo tão mais divertido.

Aos meus fiéis **amigos de Fortaleza** que não deixaram que o tempo e a distância atrapalhassem a amizade e sempre me receberam de braços abertos e com boas risadas nas minhas idas para lá durante as férias.

Aos amigos **Veneziano e Celma**, pelo encorajamento na busca do crescimento em minha profissão, por me dar a oportunidade de trabalhar na Perfil Odonto, logo após

minha formatura, onde aprendi muito. Também por me acolher em sua família, da qual me sinto e sempre quero fazer parte.

Aos queridos amigos conquistados fora dos muros da FORP-USP, **Patrícia Cruz, Marcos Teixeira, Sarah Jorge, Matheus Amorim, Ingrid Machado, Thaíse Carrasco e Taciane Machado**, por me acolherem no seu grupo (GF), pela companhia e pelas viagens juntos por este Brasil de meu Deus. Os retornos a Ribeirão Preto após os períodos de férias em casa foram mais felizes por causa de vocês.

“É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o amigo pode ajudá-lo a levantar-se. Mas pobre do homem que cai e não tem quem o ajude a levantar-se”.

Bíblia Sagrada, Eclesiastes 4: 9-10

Aos queridos amigos de luta **Juliano, Patrícia Meca e Priscila Miranda**, pelo acolhimento, amizade, compreensão, e fé. Ver o coração de vocês e o amor pela maior causa de todas têm sido fortaleza pra mim.

Aos amigos **Cleiton Fiúsa e Emanuel Lima**, pela disposição de me ouvir, amar e me aceitar como sou, com todas as minhas lutas e dificuldades. Mesmo distantes e com pouco contato, o local que vocês ocupam em meu coração nunca foi diminuído ou substituído. Quero sempre acompanhar a vida de vocês de perto. Amo vocês, como no início.

Aos queridos amigos e irmãos **Juliano, Vitão, Marcelinho e Burim**, pelos encontros semanais refletindo sobre Aquele cujas palavras são vida eterna. O compartilhar de nossas vidas me animaram muitas vezes... muitas mesmo. Ju, obrigado pela amizade fiel e pela liderança. Vitão, obrigado pela ajuda com a capa e a impressão.

Aos queridos amigos **Franzé** e **Dani**, pela amizade fiel e sempre dispostos a não permitir que a distância e o tempo façam-na perder-se. Encontrar vocês nos retornos a Fortaleza sempre foi uma alegria.

Ao amigo e irmão de alma e coração **Dave Theobald**, pelo amor incondicional, encorajamento, ensinamentos, paciência. Saber que não preciso ter máscaras com você sempre me motivará a levantar e prosseguir. Olhar pra sua vida me faz querer viver com propósitos. Mesmo distante, bem distante, sei que nossa amizade está bem guardada (“...*pois há amigo mais apegado que irmão*” – *Bíblia Sagrada, Provérbios 18:24*).

A todos os amigos que fiz durante os anos de **Movimento Estudantil Alfa e Ômega**. Seria impossível citar todos os nomes aqui, mas sempre admirarei vocês e lembrarei com saudades de momentos servindo e levando esperança a outras pessoas.

Muito obrigado.

*A fé precisa da luz da ciência para não ser cega e não se tornar
fanática e doentia; a ciência precisa da fé para não
colocar suas descobertas a serviço
da destruição humana.*

Mauri Heerdt

Resumo

REGIS, R. R. **Análise das propriedades biológicas de um monômero antimicrobiano para aplicação em prótese dentária**. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A resina acrílica para base de próteses removíveis é capaz de acumular biofilme e assim favorecer o aparecimento de diversos problemas na cavidade bucal dos usuários de próteses. A imobilização de um agente antisséptico na matriz polimérica tem potencial preventivo frente a esse acúmulo, mas necessita de maior investigação. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas do brometo de metacrilóiloxiundecilpiridínio (MUPB), um composto antisséptico capaz de copolimerizar-se com as resinas acrílicas. Foram determinadas as concentrações inibitória e fungicida/bactericida mínimas (CIM, CFM/CBM) do MUPB frente às espécies *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, em comparação ao cloreto de cetilpiridínio (CCP). A seguir, investigou-se a citotoxicidade do MUPB em fibroblastos, comparando-o com o metil metacrilato (MMA). A avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do MUPB em massa (0, 0,3% e 0,6%) incorporado em uma resina acrílica termopolimerizável para base de próteses foi realizada por meio de testes de difusão em disco e quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) aderidas à resina após contato com suspensões de cada micro-organismo. A adesão microbiana também foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Comparações entre o MUPB e as demais substâncias, bem como entre as concentrações incorporadas na resina, foram realizadas com $\alpha=0,05$. O MUPB apresentou CIM inferior ao CCP para *C. dubliniensis* e *S. mutans* ($P=0,046$ e $0,043$, respectivamente). Para as demais espécies, as diferenças não foram significantes. Para a CFM/CBM, só foi encontrada diferença significativa para *C. albicans* ($P=0,046$). O MUPB não polimerizado mostrou-se em torno de 20 vezes mais citotóxico que o MMA. Independente da concentração incorporada e da espécie, não houve crescimento de halo de inibição em torno dos espécimes. A incorporação do MUPB só influenciou na adesão de *C. albicans* ($P=0,003$), com menores contagens de UFC para o grupo com 0,6%. Conclui-se que o MUPB não polimerizado tem capacidade antimicrobiana próxima à do CCP, e alta citotoxicidade, se comparado ao MMA. A atividade antimicrobiana, após incorporação em uma resina acrílica para base de prótese, não depende de sua eluição, porém apresentou-se restrita à *C. albicans*.

Unitermos: Antiinfeciosos locais; bases de dentadura; *Candida*; compostos de amônio quaternário; estomatite sob prótese; resinas acrílicas.

Abstract

REGIS, R. R. **Biological properties of an antimicrobial monomer for application in prosthodontics**. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Acrylic resins for removable denture base are capable of accumulating biofilm and thus favor the appearance of various problems in the edentulous oral cavity. An antiseptic agent immobilized within the polymeric matrix has a preventive potential against this accumulation, but requires further investigation. The aim of this study was to evaluate the biological properties of methacryloyloxyundecylpyridinium bromide (MUPB), an antiseptic monomer capable of copolymerizing with acrylic resins. The minimum inhibitory and fungicidal/bactericidal concentrations (MIC, MFC/MBC) of MUPB were determined against the species *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*, in comparison with cetylpyridinium chloride (CCP). After this, the cytotoxicity of MUPB was investigated in fibroblasts, compared with methyl methacrylate (MMA). The antimicrobial activity of different concentrations of MUPB (0, 0.3% and 0.6% w/w) incorporated into a heat polymerized denture base acrylic resin was evaluated by means of disk diffusion tests, and the CFUs adhered to the resin after contact with suspensions of each microorganism were quantified. Microbial adhesion was also evaluated by scanning electron microscopy. Comparisons were made between MUPB and the other substances, as well as between the concentrations incorporated into the resin ($\alpha=.05$). MUPB presented a lower MIC than CCP for *C. dubliniensis* and *S. mutans* ($P=.046$ and $.043$, respectively). For the other species, the differences were not significant. For MFC or MBC, significant difference was found only for *C. albicans* ($P=.046$). Non polymerized MUPB was shown to be 20 times more cytotoxic than MMA. Irrespective of the concentration incorporated and the species, there was no growth of inhibition halo around the specimens. The incorporation of MUPB only influenced the adhesion of *C. albicans* ($P=.003$), with lower CFU counts for the group with the concentration of 0.6%. It was concluded that non polymerized MUPB has an antimicrobial capacity close to that of CCP, and high cytotoxicity when compared with MMA. The antimicrobial activity after incorporation within a denture base acrylic resin did not depend on its elution, but was shown to be restricted to *C. albicans*.

Uniterms: Local Anti-infective agents; denture bases; *Candida*; quaternary ammonium compounds; denture stomatitis; acrylic resins.

Sumário

Sumário

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 Adesão de micro-organismos aos materiais para base de prótese	27
2.2 Incorporação de agentes antimicrobianos	34
2.3 Agentes antimicrobianos copolimerizáveis	44
2.4 Citotoxicidade dos polímeros odontológicos	60
3. PROPOSIÇÃO	62
3.1 Objetivo geral	63
3.2 Objetivos específicos	63
4. MATERIAL E MÉTODO	64
Material	65
Método	67
4.1 Síntese do MUPB	67
4.2 Propriedades do MUPB não polimerizado	69
4.2.1 Concentração inibitória mínima	69
4.2.2 Concentração fungicida/bactericida mínima	70
4.2.3 Citotoxicidade	71
4.2.4 Atividade mitocondrial	72
4.3 Atividade antisséptica do MUPB incorporado a uma resina acrílica	73
4.3.1 Obtenção dos espécimes	73
4.3.2 Esterilização dos espécimes	77
4.3.3 Efeito inibitório sobre o crescimento dos micro-organismos	78
4.3.4 Adesão dos micro-organismos à resina acrílica	80
4.4 Análise dos resultados	82
5. RESULTADOS	83
6. DISCUSSÃO	96
7. CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	109

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços nas políticas públicas para prevenção em saúde bucal, a demanda por próteses totais ainda é grande em nosso país (BRASIL, 2004). Essas próteses, apesar de indicadas como tratamento reabilitador na grande maioria dos casos de edentulismo total, interferem rapidamente na microbiota da boca edentada e podem proporcionar um meio favorável ao desenvolvimento de infecções (CARLSSON, 1998). Dentre os processos infecciosos relacionados ao uso de próteses totais, destaca-se a estomatite protética, devido à sua alta ocorrência (MARCHINI et al., 2004; RAMAGE et al., 2004; SCHNEID, 1992).

Em geral, o desenvolvimento da estomatite protética associa-se a fatores como as características intrínsecas do aparelho (porosidades e irregularidades), instruções deficientes quanto à higiene das próteses, menor destreza manual dos pacientes e desinformação quanto à necessidade de retornos periódicos para manutenção (AMBJORSEN; RISE, 1985; DILLS et al., 1988; MARCHINI et al., 2004; MURTOMAA; MEURMAN, 1992; OHMAN et al., 1995; SESMA et al., 2005; WENDT, 1985).

Próteses confeccionadas em resina acrílica têm um papel importante como reservatório de micro-organismos, elevando o risco de colonização por fungos do gênero *Candida* (COMPAGNONI et al., 2007; HE et al., 2006; KENG; LIM, 1996; RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999). A adesão desses micro-organismos à superfície da prótese é um passo importante na iniciação e propagação da estomatite protética (NIKAWA et al., 2000; RAMAGE et al., 2004). Embora a *Candida albicans* seja a espécie mais comumente isolada (ABU-ELTEEN; ABU-ALTEEN, 1998; RAMAGE et al., 2004), outras espécies são frequentemente encontradas na mucosa palatal e superfície protética: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida dubliniensis* (HE et al., 2006; NIKAWA et al., 2000; SCULLY; EL-KABIR; SAMARANAYAKE et al., 1994). Além disso, bactérias como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* têm grande importância na colonização inicial das superfícies protéticas e formação dos biofilmes orais (CARLSSON; SODERHOLM; ALMFELDT, 1969; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2006).

Define-se biofilme como uma camada microbiana densa, sendo constituído por mais de 10^{11} micro-organismos por grama em peso seco (NIKAWA et al., 1999), o qual funciona como um dos mecanismos de resistência bacteriana. Essa organização provoca alterações na

função celular que tornam os micro-organismos mais resistentes, além de impor uma barreira física aos agentes antissépticos. Por ser o maior fator etiológico da estomatite protética (NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998), o biofilme microbiano deve ser eficazmente controlado. Para isso, métodos mecânicos (escovação com água, sabão, pastas ou abrasivos, e aparelhos de ultra-som) e químicos (antissépticos, enzimas, ácidos, enxaguatórios bucais e desinfetantes), podem ser utilizados, isoladamente ou combinados (JAGGER; HARRISON, 1995; NIKAWA et al., 1999; PARANHOS et al., 2007).

Apesar de os meios de higiene constituírem formas importantes de controlar a formação de biofilme protético, outras estratégias têm sido investigadas. Estudos prévios investigaram a incorporação de agentes antimicrobianos como nistatina, miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, clorexidina, triclosan, zeólito de prata e zinco e dióxido de titânio em reembasadores temporários e condicionadores de tecido, bem como em resinas acrílicas, de onde o princípio ativo sofre liberação gradual (CASEMIRO et al., 2008; CHOW; MATEAR; LAWRENCE, 1999; EL-CHARKAWI et al., 1994; LEFEBVRE et al., 2001; QUINN, 1985; SHIBATA et al., 2007; URBAN et al., 2006; WILSON; WILSON, 1993). No entanto, o uso desses métodos não é interessante em resinas acrílicas para uso prolongado, pois, além das propriedades antibacterianas se perderem com o tempo, a eluição do agente pode levar a efeitos tóxicos na mucosa do paciente, bem como a alterações radicais na microbiota, além de aumentar a deterioração do material (IMAZATO et al., 1994).

Pesquisas recentes têm buscado uma redução na suscetibilidade de polímeros odontológicos à adesão microbiana. As opções incluem tratamento superficial com plasma (YILDIRIM et al., 2005, 2006), vernizes (SESMA et al., 2005) e incorporação de compostos de fluoralquila (CUNHA et al., 2009). Outras opções buscam conferir atividade antisséptica à resina acrílica sem depender de eluição de agentes; nessa linha, destaca-se a incorporação de nanopartículas de prata metálica (MONTEIRO et al. 2009) e compostos de amônio quaternário copolimerizáveis (IMAZATO et al. 1995; PESCI-BARDON et al., 2004; SEYFRIEDSBERGER; RAMETSTEINER; KERN, 2006). Uma possível vantagem da última opção seria a ligação química covalente do composto antisséptico ao polímero odontológico, tornando-os fortemente integrados (IMAZATO, 2003).

O brometo de metacriloiloxidodecilmiridínio (MDPB) é um desses compostos de amônio quaternário que vem sendo bastante estudado para aplicação em materiais restauradores diretos. Incorporado a resinas compostas e sistemas adesivos, o MDPB

demonstrou significativa inibição do crescimento bacteriano e do acúmulo de biofilme formado por *S.mutans* em sua superfície (IMAZATO et al. 1992, 1994). O MDPB é um composto do tipo éster que possui um grupo dodecilmiridínio associado a um grupo metacrilato (Fig.1).

Figura 1 - Fórmula estrutural do MDPB (IMAZATO et al., 1994, p. 1438, adaptação nossa).

Alguns estudos avaliaram a incorporação do MDPB em resina composta (IMAZATO et al., 1994, 1995, 1999) e *primers* dentinários (IMAZATO et al., 1997, 1998a, 2000, 2001, 2002). Apenas um teste preliminar foi conduzido com resinas acrílicas, por ocasião da patente do MDPB (KURARAY COMPANY, 1995), encontrando efeito contra o crescimento de *S. mutans* e demonstrando capacidade de copolimerização com resinas acrílicas comercialmente disponíveis.

A rota sintética empregada na obtenção do MDPB foi descrita previamente (IMAZATO et al., 1995). Nela utiliza-se um haleto de alquila, o 12-bromo-1-dodecanol, a fim de gerar a cadeia alifática no centro da molécula. Essa estrutura tem a função de distanciar o radical biocida (amônio quaternário) da porção polimerizável (radical metacrilato) e tornar os radicais catiônicos disponíveis na superfície do material (PESCI-BARDON et al., 2004). No entanto, o 12-bromo-1-dodecanol apresenta um custo relativamente elevado, justificando o uso de um substituto, como o 11-bromo-1-undecanol, o qual apresenta grandes semelhanças ao 12-bromo-1-dodecanol, porém a um custo de produção mais de 10 vezes menor (SIGMA-ALDRICH, 2009).

Dessa forma, este projeto busca investigar as propriedades do composto de amônio quaternário brometo de metacrilatoioxiundecilmiridínio (MUPB), derivado do 11-bromo-1-undecanol, o qual copolimeriza-se junto a outros monômeros de uso odontológico.

2. Revisão de Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Adesão de micro-organismos aos materiais para base de prótese

A estomatite protética é uma doença de grande prevalência em usuários de próteses totais, cuja etiologia está relacionada a fatores locais e sistêmicos. A presença do biofilme formado por meio de um processo de adesão, agregação e crescimento microbiano é o principal fator etiológico geralmente associado a uma higiene inadequada do aparelho protético (CAMPOS et al., 2008). Marchini et al. (2004) avaliaram as condições bucais e relatos de higiene de 236 usuários de próteses totais que buscavam tratamento para a confecção de novos aparelhos. Observou-se a presença de estomatite protética em 42,4% dos indivíduos, cuja maioria revelou ter falta de instrução relativa à higiene das próteses. Boa parte dos participantes relatou desinformação quanto à necessidade de retornos para manutenção (91,9%) e que não teriam sido orientados quanto a métodos adequados de higiene bucal (77,5%). Apenas 26,3% dos indivíduos removiam as próteses à noite, antes de dormir.

Os biofilmes são conceituados como comunidades caracterizadas por células que formam microcolônias irreversivelmente aderidas a um substrato, embebidas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas. Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza, atuando no desenvolvimento de infecções por servirem de nicho para agentes patogênicos e estão associados a altos índices de resistência a agentes antimicrobianos (DONLAN, 2001; KUHN et al., 2002).

Apesar de a *C. albicans* ser a espécie mais comumente isolada da mucosa palatal e superfície protética, outras são frequentemente encontradas, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*, além de bactérias como *S. mutans* e *S. sanguis* (ABU-ELTEEN; ABU-ALTEEN, 1998; CARLSSON; SODERHOLM; ALMFELDT, 1969; HE et al., 2006; NIKAWA et al., 2000; RAMAGE et al., 2004; SCULLY; EL-KABIR; SAMARANAYAKE et al., 1994; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2006). A adesão de *Candida* à superfície da resina acrílica, considerada o primeiro passo para o desenvolvimento dos processos infecciosos, pode ocorrer de forma direta ou por meio de uma camada intermediária de biofilme bacteriano sendo essencial para que não ocorra remoção dos micro-organismos pela ação salivar ou dos alimentos durante a deglutição (BRANTING et al., 1989; EDGERTON et al., 1993; SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1980).

Alguns fatores estão envolvidos na adesão de *Candida* às superfícies das resinas acrílicas utilizadas na confecção de próteses removíveis. A energia livre de superfície e rugosidade do material, hidrofobicidade celular superficial (HCS) e do substrato influenciam nessa adesão inicial, bem com características da saliva humana e as interações entre micro-organismos. Uma revisão recente mostrou que existe consenso em relação a importância desses fatores na formação dos biofilmes, entretanto, os resultados são contraditórios quanto ao mecanismo de ação desses fatores, se agem aumentando ou diminuindo essa formação de biofilme (PEREIRA-CENCI et al., 2008a).

Samaranayake et al. (1995) estudaram a hidrofobicidade de isolados clínicos de *C. krusei* e *C. albicans*, comparando com os valores de adesão dessas espécies à superfície de resinas acrílicas e de células epiteliais. A espécie *C. krusei* apresentou maiores valores de hidrofobicidade quando comparados a outra espécie. Os autores afirmam que a diferença se deve à estrutura da parede celular da *C. krusei*. Correlação positiva entre os valores de hidrofobicidade e adesão do micro-organismo só foi encontrada entre a espécie *C. krusei* e células epiteliais. Assim, outras forças estariam envolvidas na adesão dos micro-organismos em questão aos aparelhos protéticos confeccionados com esse tipo de material. Com esses resultados, os autores apontam que o atributo de alta hidrofobicidade da superfície celular, isoladamente, seria inadequado para justificar a patogenicidade de um micro-organismo. Assim, a hidrofobicidade da superfície celular fúngica é um fator que atua juntamente com outros, tais como produção de enzimas extracelulares e formação de hifas na determinação da virulência.

Ramage et al. (2001) descreveram as características do desenvolvimento de um biofilme de *C. albicans*. A cinética de formação do biofilme sobre placas de poliestireno, pré-tratadas ou não com soro e saliva, utilizando-se alíquotas de uma suspensão de *C. albicans*, foi avaliada pelo método colorimétrico com sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT). As primeiras duas horas foram caracterizadas por adesão inicial das células, seguidas por germinação e formação de microcolônias (2-4 horas), filamentação (4-6 horas), desenvolvimento de monocamada (6-8 horas), proliferação (8-24 horas) e maturação (24-48 horas). O método XTT mostrou uma relação linear entre a densidade celular do biofilme e a atividade metabólica. O pré-tratamento com saliva e soro aumentou a adesão inicial do fungo ao poliestireno. Por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal a laser (MCL), os autores

observaram que os biofilmes consistiam de uma estrutura complexa tridimensional, com densa rede de leveduras e hifas circundadas por um material exopolimérico. Quando organizado em biofilmes, a *C. albicans* apresentou maior resistência à ação dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

Luo e Samaranayake (2002) investigaram in vitro 34 isolados de *C. glabrata* e 15 de *C. albicans*. Os autores encontraram diferenças entre as espécies tanto em relação a HCS quanto ao padrão de adesão a superfícies acrílicas. Em comparação a *C. albicans*, a *C. glabrata* demonstrou maiores valores de HCS e maior tendência de aderência a superfícies desse tipo. Foi encontrada correlação positiva entre a HCS e a adesão para ambas as espécies, entretanto de forma mais expressiva para *C. glabrata*.

Serrano-Granger et al. (2005) investigaram se pequenas variações na composição do poli (metil metacrilato) (PMMA) tinham influência no grau de adesão de *C. albicans*, em função da energia de superfície do material. Foram confeccionados espécimes com 11 diferentes resinas acrílicas à base de PMMA. Por meio do método do ângulo de contato, a energia livre de superfície foi calculada. Após incubação dos espécimes em suspensões de *C. albicans*, estes foram devidamente corados e levados ao microscópio óptico de fluorescência, onde a contagem de células aderidas foi realizada. Diferenças na adesão fúngica foram encontradas para alguns materiais. Entretanto, os valores de energia de superfície foram bem similares, não demonstrando, assim, relação entre a adesão de *C. albicans* e a energia de superfície. Os autores atribuem as diferenças de adesão encontradas possivelmente aos produtos residuais pós-polimerização.

He et al. (2006) investigaram a adesão de diversas espécies de *Candida* a diferentes resinas acrílicas. Foram utilizadas 2 resinas acrílicas termicamente ativadas e outras 2 quimicamente ativadas. Espécimes foram obtidos, esterilizados e incubados em suspensões de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*. Após incubação, as células aderidas foram contadas, por meio de um microscópio, com software próprio. Foi observado que, para a resina acrílica termicamente ativada Vertex, houve adesão apenas da espécie *C. glabrata*. Houve diferenças na adesão entre tipo de micro-organismo e marca da resina. Os autores concluíram que a adesão de *Candida* varia de acordo com a qualidade da resina, bem como com a espécie. As resinas termicamente ativadas tendem a ter menos colônias aderidas do que

as quimicamente ativadas, o que pode ser atribuído à energia livre de superfície, que é diferente para cada método de polimerização.

O efeito da saliva, da rugosidade superficial e da energia livre de superfície de uma resina acrílica para base de prótese sobre a adesão da *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* em resinas acrílicas termo ativadas de forma convencional ou por energia de micro-ondas foi avaliado por Moura et al. (2006). Após obtenção dos espécimes, a rugosidade superficial e a energia de superfície foram medidas e parte deles recebeu tratamento prévio com saliva humana. Após incubação com suspensões de cada micro-organismo, os espécimes foram devidamente corados e levados ao microscópio ótico para contagem de células aderidas. Maior energia livre de superfície foi encontrada para o grupo da resina convencional, não havendo diferença para os valores de rugosidade entre as resinas testadas. Entretanto, não foi encontrada correlação entre esses dois parâmetros e a adesão fúngica. Para todas as espécies, a adesão de *Candida* diminuiu com a presença da saliva, não sendo influenciada pelo método de polimerização empregado.

Thein, Samaranayake e Samaranayake (2006) avaliaram, in vitro, o efeito quantitativo e qualitativo de oito espécies de bactérias aeróbias e anaeróbias presentes na cavidade bucal sobre a formação do biofilme de *C. albicans*. Foram preparadas suspensões de 4 espécies formadoras de biofilme (*Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus*, *S. mutans* e *Streptococcus intermedius*), 2 periodontopatogênicas (*Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*) e 2 colonizadoras transitórias da cavidade bucal (*P. aeruginosa* e *E. coli*), nas concentrações 5×10^6 , $2,5 \times 10^6$, $1,25 \times 10^6$ e $6,25 \times 10^5$ organismos/ml. Após realização do protocolo de formação do biofilme interagindo a *C. albicans* com as diversas concentrações de cada bactéria, quantificou-se o crescimento fúngico por meio de contagem de células viáveis e confirmou-se a formação do biofilme por MEV. Os resultados encontrados mostram interação entre as bactérias estudadas e a *C. albicans* de uma forma complexa na modulação da matriz do biofilme bacteriano/fúngico. Para *A. israelii* foi observada inibição da formação do biofilme nas maiores concentrações, entretanto houve um aumento na viabilidade da formação do biofilme em baixas concentrações. O *L. acidophilus* suprimiu a formação desse biofilme em aproximadamente 36%. A *P. aeruginosa*, em todas as concentrações testadas, promoveu uma inibição significativa de até 81% na formação do biofilme. O biofilme foi reduzido na presença da maior concentração de *E. coli*, entretanto não foi influenciado pelos micro-organismos do gênero *Streptococcus*. A análise por MEV da

co-cultura do fungo com a *P. aeruginosa* mostrou redução no crescimento das hifas demonstrando, juntamente com os resultados quantitativos, como bactérias modulam a formação de biofilme em ambientes como a cavidade bucal.

Pereira-Cenci et al. (2008a) apresentaram uma revisão de literatura onde foram discutidos fatores importantes que controlam a adesão de espécies de *Candida* à resina acrílica para base de prótese e materiais reembasadores. Os autores abordam propriedades de superfície como rugosidade e energia livre de superfície, características topográficas dos materiais reembasadores, a influência dos componentes salivares, o surgimento de outras espécies de *Candida*, bem como a interação com bactérias. Segundo os autores, existe um consenso em relação a importância desses fatores, porém resultados contraditórios têm sido encontrados. Alguns estudos são apresentados demonstrando que a energia de superfície e a rugosidade superficial estão associadas à adesão inicial, porém as alterações relacionadas a elas, a longo prazo, não foram estudadas, bem como não existem estudos in vivo demonstrando se o tipo de substrato é um fator crítico para o acúmulo de biofilme durante longos períodos na cavidade bucal. Quanto à saliva, existem trabalhos nos quais ela aumentou, reduziu ou não teve efeito na formação de biofilme de *Candida*. Essas diferenças são atribuídas às variações na coleta e manipulação da saliva. Inúmeros estudos tratam do papel crucial que as bactérias desempenham para o sucesso do estabelecimento da *Candida* em biofilmes, mas o significado clínico dessa observação ainda necessita de confirmação. Os autores apontam a necessidade de padronização dos procedimentos experimentais, da correlação dos resultados obtidos em estudos laboratoriais com os de estudos in vivo, bem como da importância de uma melhor investigação dos fatores que modulam a adesão inicial e subsequente colonização dos materiais para que, ao controlar esses fatores, a estomatite protética possa ser prevenida.

Pereira-Cenci et al. (2008b) investigaram a formação de biofilme de uma e duas espécies fúngicas em diferentes substratos e os efeitos da saliva e da bactéria *S. mutans* nesse processo. Os substratos utilizados foram hidroxiapatita (HA), PMMA e reembasador resiliente (RR) e as espécies fúngicas avaliadas, *C. albicans* e *C. glabrata*. Previamente aos testes microbiológicos, a superfície dos espécimes foi analisada por meio de MEV, os quais apresentaram diferentes graus de irregularidades superficiais. Os materiais reembasadores apresentaram a maior quantidade de irregularidades e porosidades. Após contato dos substratos, tratados ou não com saliva, com os micro-organismos e formação dos biofilmes de um ou dois tipos de fungos, foi contado o número de unidades formadoras de colônia (UFC)

por área de superfície. Houve maior formação de biofilme, independente se de um ou dois tipos de fungos, na HA, seguido do PMMA e do RR. A contagem de UFC por área foi maior para a *C. glabrata* que para a *C. albicans*. O tratamento dos espécimes com saliva não afetou a formação de biofilme na espécie *C. albicans*, influenciando apenas em algumas condições avaliadas para o outro fungo. Por meio de microscópio confocal de varredura a laser, foi realizada uma análise da estrutura dos biofilmes e as hifas quantificadas em cada situação testada. A presença de *S. mutans* diminuiu a produção de hifas de *C. albicans*. Os biofilmes de ambas os fungos não apresentaram interações competitivas entre as espécies. Os autores concluíram que os biofilmes de *Candida* são significativamente afetados pela saliva, tipo de substrato e pela presença de outros micro-organismos.

Charman et al. (2009) determinaram o efeito da rugosidade superficial de resinas acrílicas termo e autopolimerizáveis, para base de próteses, na adesão de *Streptococcus oralis*. Os espécimes foram confeccionados, submetidos a diferentes regimes de escovação com diferentes dentifrícios e, após mensuração da rugosidade superficial, os mesmos foram incubados em suspensões do micro-organismo por 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 min. Após incubação, os espécimes foram devidamente corados e levados ao microscópio óptico para contagem de células aderidas. Os resultados mostraram correlação direta entre o aumento do biofilme microbiano e aumento do tempo de incubação e rugosidade superficial. Os autores apontam que as ranhuras causadas pela escovação das próteses propiciam a adesão bacteriana. Assim, higienizadores menos abrasivos devem ser desenvolvidos e seu uso encorajado.

De Souza et al. (2009) investigaram as diferenças na hidrofobicidade superficial celular (HSC) entre cepas de *C. albicans* obtidas de pacientes idosos institucionalizados usuários de próteses totais, com e sem sinais clínicos de estomatite protética. Biofilme foi coletado das superfícies protéticas, e as colônias de *C. albicans* identificadas. A avaliação da HSC foi feita por meio do teste de partição de hidrocarbono utilizando-se o xileno, onde a HSC foi expressa como a porcentagem de adesão das células fúngicas ao xileno. Foi observado que as cepas de pacientes com estomatite protética apresentaram HSC média de $8,22 \pm 2,92\%$, ao passo que, para o grupo sem apresentar a infecção, essa média foi de $8,38 \pm 3,76\%$, não havendo diferença significativa entre eles. Os autores concluíram que populações naturais de *C. albicans* isoladas de pacientes edentados com e sem manifestação clínica de estomatite protética não se diferenciam quanto a hidrofobicidade de suas superfícies. Assim, a

virulência desse fungo também deve ser atribuída a outros fatores inerentes tanto ao micro-organismo quanto ao hospedeiro.

2.2 Incorporação de agentes antimicrobianos

O tratamento da estomatite protética inclui reparo ou troca das próteses removíveis, adoção de medidas de limpeza e desinfecção dos aparelhos pelo paciente, bem como a prescrição de drogas antifúngicas (CHOW; MATEAR; LAWRENCE, 1999). Essas medidas visam a reduzir o crescimento dos micro-organismos envolvidos, como os fungos do gênero *Candida*, levando-os a um nível que possa ser controlado pelas defesas do hospedeiro (URBAN et al., 2006). Entretanto, para pacientes idosos ou institucionalizados, muitas vezes com habilidades motoras limitadas, esse tratamento se torna complicado por fatores como perda de memória e dificuldade de realização de limpeza adequada das próteses. Ainda, a aplicação dos agentes antifúngicos pode ser difícil nesses pacientes, tanto pelo fato de essas drogas apresentarem gosto desagradável quanto por exigirem uma alta frequência de aplicação feita muitas vezes com o auxílio de cuidadores. Sua efetividade pode ser comprometida em muitos casos em que os pacientes não conseguem cessar o uso contínuo das próteses. Por fim, o tratamento da estomatite protética muitas vezes representa custos com uma necessidade não percebida pelo paciente, o que dificulta ainda mais a aderência ao protocolo estabelecido pelo cirurgião dentista (PIETROKOVSKI et al., 1995; SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994). Assim, o desenvolvimento de outros métodos para a aplicação de agentes antimicrobianos na cavidade bucal do indivíduo tem sido estimulado. A incorporação desses agentes às bases protéticas pode vencer as limitações previamente citadas, além de evitar que a saliva e a deglutição dificultem a manutenção de uma concentração efetiva na cavidade bucal.

Com o intuito de reduzir ou eliminar a proliferação de micro-organismos nas superfícies protéticas, vários autores têm investigado a incorporação de agentes antimicrobianos em materiais poliméricos aplicados nas bases de próteses removíveis e nos reembasamentos. O efeito antimicrobiano desses materiais se dá pela liberação gradual dos compostos, no intuito de proporcionar uma maior duração da efetividade terapêutica, se comparada à aplicação tópica convencional (ADDY, 1981). Dentre outras vantagens, destacam-se redução do custo, já que uma menor quantidade da droga é utilizada em comparação à terapia convencional, bem como redução na frequência de aplicação. Agentes incorporados também não necessitam da mesma aceitação e colaboração por parte do paciente, necessária para os protocolos convencionais (CHOW; MATEAR; LAWRENCE, 1999).

A clorexidina possui atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de micro-organismos, incluindo a *C. albicans*. Sua ação antimicrobiana se dá por promover perda de integridade estrutural, diminuição da capacidade de adesão e fragmentação da parede celular (MACNEILL et al., 1997). O potencial de resinas acrílicas em armazenar e liberar medicamentos foi investigado por Addy (1981). O autor incorporou acetato de clorexidina em materiais reembasadores macios e em resinas acrílicas termo e autopolimerizáveis, nas concentrações de 2, 5 e 10%, e avaliou a liberação da clorexidina por meio de teste de difusão em disco frente a *S. aureus*, bem como o padrão de incorporação da droga nesses materiais. Mensurações espectrofotométricas e pelo teste de difusão mostraram que a duração de liberação da clorexidina no meio cresceu de acordo com o aumento do teor do antimicrobiano presente. Para os grupos de maior concentração, a liberação da clorexidina ultrapassou 100 dias. MEV da superfície lisa e da região de fratura do material evidenciou presença da clorexidina por toda a matriz do material. Quando repetida após imersão dos espécimes em água, a microscopia mostrou orifícios ao longo do espécime, principalmente na superfície, indicando liberação do material.

Lamb e Martin (1983) investigaram a difusão da clorexidina, *in vitro* e *in vivo*, a partir de resina acrílica autopolimerizável, no intuito de determinar a quantidade mínima suficiente para prevenir ou curar candidíase palatina. No teste *in vitro*, os grupos experimentais foram obtidos com concentrações de 2,5, 5,0, 7,5 e 10% de acetato de clorexidina. Os espécimes foram imersos em água a qual, periodicamente, era trocada. Para avaliar a ação fungicida da clorexidina liberada na água, a mesma foi inoculada em placas contendo *C. albicans* em meio de cultura. Pela mensuração do halo de inibição formado, foi observado que a clorexidina presente no polímero estudado é liberada por até três semanas quando misturada na proporção de 7,5% em massa. Determinada essa concentração, foram confeccionadas placas palatinas em ratos Wistar nos quais foi induzido o desenvolvimento de candidíase. Após avaliação dos tecidos palatinos dos ratos, bem como do biofilme formado sobre esse tecido, a presença da clorexidina na placa não só preveniu a formação de biofilme como manteve íntegro o epitélio, após análise histológica. Entretanto, animais com placas sem clorexidina apresentaram epitélio palatino hiperplásico infiltrado com células inflamatórias e com penetração de hifas fúngicas em sua superfície, bem como o biofilme coletado do palato pode ser cultivado, com presença de crescimento de colônias.

A ação antifúngica da nistatina ocorre através da sua reação com o ergosterol, esteroide presente na membrana plasmática dos fungos, o que provoca sua desorganização estrutural (SILVA et al., 2006). El-Chakawi et al. (1994) incorporaram nistatina e polinoxina em materiais reembasadores e avaliaram a eficácia antifúngica desse material frente a *C. albicans*, a menor concentração de cada droga necessária para conferir atividade fungicida ao reembasador, tempo de ação, bem como influência das drogas nas propriedades mecânicas e composição química do polímero. Foi observado que a adição da nistatina nas concentrações avaliadas (3, 5 e 10%) foi efetiva contra *C. albicans*, havendo uma relação direta entre concentração da droga e seu tempo de ação. Mesmo na maior concentração, a presença da droga não alterou as propriedades de resistência do material. Por outro lado, a polinoxina só teve efeito inibitório sobre o fungo quando em altas concentrações (40-60%), as quais afetaram as propriedades de resistência do material.

Chow, Mater e Lawrence (1999) investigaram a efetividade da incorporação de antifúngicos (nistatina, fluconazol e itraconazol) em condicionadores de tecido, como meio de liberação dessas drogas. As drogas foram incorporadas nas concentrações 1, 3, 5, 7, 9 e 11 % em massa. Logo que os dois componentes foram misturados, o conjunto obtido foi injetado em orifícios feitos em placas de Petri inoculadas com suspensões de *C. albicans* e, após incubação por períodos de tempo determinados, o halo de inibição formado foi medido. Os orifícios contendo apenas o reembasador sem incorporação do antifúngico não demonstrou inibição efetiva do crescimento dos micro-organismos. O itraconazol apresentou maior atividade fungicida que o fluconazol, enquanto que a nistatina apresentou a menor atividade ($p < 0,05$). O pico de atividade dos antifúngicos se deu entre 65 e 89 horas. Os autores concluíram que o tratamento da estomatite protética por incorporação de drogas antifúngicas é eficaz, indicando a combinação itraconazol a 5% nos materiais reembasadores testados (Coe Soft ou Fitt), com troca do material a cada três dias para garantir sua máxima efetividade.

O triclosan é um agente antimicrobiano que tem sido utilizado em dentífrícios e enxaguatórios bucais, cuja eficiência na redução de biofilme e gengivite tem sido comprovada (TRIRATANA et al., 2002). Entretanto, quando testado frente a espécies de *Candida*, estudos têm demonstrado a sua ineficácia na inibição do crescimento fúngico. Giuliana et al. (1997) compararam a eficácia antifúngica de um enxaguatório bucal à base de triclosan a outras soluções à base de clorexidina 0,2% e cloreto de cetilpiridínio 0,05%, dentre outras. Os testes foram conduzidos frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C.*

glabrata e *Saccharomyces cerevisiae*. Foi determinada a concentração fungicida mínima dos antimicrobianos frente a cada espécie por meio de teste de diluição em caldo. O cloreto de cetilpiridínio apresentou-se mais efetivo quando comparados aos outros produtos. Tanto o CCP quanto a clorexidina demonstraram efeito letal contra todas as espécies, sem diferença significativa entre eles. No entanto, o enxaguatório à base de triclosan não apresentou efeito letal algum nas espécies do gênero *Candida*.

Lefebvre et al. (2001) investigaram se a adição de um composto com triclosan a um material reembasador para prótese total inibiria o crescimento de *C. albicans* nas superfícies externas e internas do material, bem como seu efeito citotóxico. Espécimes foram obtidos, utilizando a proporção 1:80 do composto com triclosan, dos quais parte foi imerso em saliva artificial estéril para promover a eluição dos ftalatos, no intuito de eliminar o efeito citotóxico desses compostos presentes nos materiais reembasadores. Para avaliação da citotoxicidade, fibroblastos de ratos foram devidamente cultivados, distribuídos em poços de microplacas, onde foram posicionados os espécimes. Foi medida a atividade da desidrogenase succínica por meio do teste colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que reflete a atividade mitocondrial e a produção energética celular. A diferença de densidade óptica encontrada no grupo controle não foi significativa em relação às dos outros grupos, independente da imersão em saliva. Para ensaio de crescimento fúngico, cepas de *C. albicans* foram cultivadas e espécimes de cada grupo imersos. Após incubação, os espécimes foram removidos, lavados para remoção de células fracamente aderidas e agitados em tubos com salina estéril. A partir desse eluato, diluições seriadas foram realizadas e o número de colônias contado. Não foi encontrada diferença significativa entre os valores de crescimento fúngico na superfície dos discos, independente da presença do triclosan. Para avaliar o crescimento fúngico interno, outros espécimes passaram pelo mesmo processo de contaminação e foram fatiados com lâminas estéreis, agitados em salina e, a partir disso, diluições seriadas foram realizadas e o número de colônias contadas. Para esse teste, não foram detectadas colônias em ambos os grupos, indicando a ausência de células viáveis. Foi concluído que a presença do triclosan não altera a citotoxicidade do material reembasador, bem como não inibe crescimento fúngico. Os autores atribuem esses resultados às baixas solubilidade e concentração do triclosan recomendadas pelo fabricante.

Amin et al. (2009) incorporaram drogas antimicrobianas (fluconazol, clorexidina e a combinação dos dois) em uma resina acrílica autopolimerizável à base de PMMA para base

de prótese e investigaram a liberação dessas drogas bem como seu efeito no crescimento de *C. albicans*. Foram confeccionados espécimes com o material polimérico, contendo 10% em massa de cada antifúngico. Um grupo foi obtido contendo os dois agentes, 5% em massa de cada um. Os espécimes foram imersos em água destilada por períodos estabelecidos de até quatro semanas e, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foi realizada análise dos componentes antifúngicos liberados para a água destilada. Após cada troca do meio aquoso, alíquotas foram inoculadas em orifícios em placas de Petri cultivadas com *C. albicans*, para posterior avaliação da inibição do crescimento fúngico por meio de mensuração do halo de inibição. Os resultados mostraram que as duas drogas isoladas ou a combinação delas podem ser incorporadas com o PMMA. Foi evidenciada liberação das drogas para água destilada, o que se manteve contínuo ao longo de 28 dias. A inibição do crescimento foi encontrada em todos os grupos, com valores mais expressivos para o grupo onde as duas drogas foram combinadas.

Redding et al. (2009) investigaram a capacidade de um agente de cobertura contendo medicação antifúngica de inibir a formação de biofilme de *Candida* quando aplicado à base protética. Ao agente de cobertura foram incorporados diacetato de clorexidina a 1 %, nistatina a 1% e anfotericina B a 0,1%. Após aplicação do agente nos espécimes em resina acrílica, os mesmos foram levados a uma máquina de escovação e submetidos a um ciclo que simulou limpeza diária da prótese por 1 minuto durante 1 ano. Os espécimes foram incubados em suspensões do micro-organismo e a extensão da formação de biofilme foi avaliada por meio do método XTT. Uma pequena redução do biofilme foi encontrada no grupo contendo apenas o agente de cobertura sem a presença dos antifúngicos em comparação com o grupo sem aplicação do agente. Entretanto, uma redução significativa de 70 a 80% foi encontrada para o grupo contendo nistatina, de 50 a 60% para o grupo contendo anfotericina B e até 98% para o grupo contendo clorexidina.

Zeólitos antimicrobianos são cristais de silicato de alumínio, em cujos espaços vazios presentes na sua estrutura são depositados cátions como prata e zinco e que, com o tempo, são permutados com outros cátions presentes no ambiente (HOTTA et al., 1998; KAWAHARA et al., 2000; NIKAWA et al., 1997). Assim, os cátions antimicrobianos livres entram em contato com os micro-organismos do meio, suprimindo seu desenvolvimento, inativando enzimas microbianas vitais, interrompendo replicação de RNA e bloqueando sua respiração por meio de processo oxidativo (LIAU et al., 1997; RUSSELL; HUGO, 1984; THURMAN; GERBA,

1989). Devido às suas propriedades antimicrobianas e outras características como baixa toxicidade, falta de odor ou sabor, inúmeras aplicações na Odontologia têm surgido, como em materiais reembasadores (MATSUURA et al., 1997; NIKAWA et al., 1997), resinas acrílicas (CASEMIRO et al., 2008), enxaguatórios bucais (MORISHITA et al., 1998), materiais restauradores temporários (HOTTA et al., 1998).

A eficácia antimicrobiana dos zeólitos já tem sido demonstrada. Kawahara et al. (2000) investigaram sua ação frente às bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, importantes micro-organismos periodontopatogênicos, *S. mutans*, *S. sanguis*, *A. viscosus*, patógenos envolvidos na etiologia da cárie dentária e o *S. aureus*, micro-organismo isolado da cavidade bucal e envolvido em infecções respiratórias. Os autores encontraram inibição do crescimento de todas as espécies estudadas quando em contato com o zeólito de prata, apontando-o como veículo útil para conferir atividade antimicrobiana a materiais odontológicos.

Casemiro et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de resinas acrílicas contendo diferentes concentrações de zeólito de zinco e prata (0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10%), bem como se essa incorporação altera a resistência à flexão e ao impacto das resinas. A avaliação das propriedades antimicrobianas foi realizada frente a *C. albicans* e *S. mutans*, onde foi encontrada atividade antimicrobiana da resina acrílica contendo o zeólito de prata e zinco a partir da concentração 2,5%. Apesar desse resultado, os autores encontraram prejuízo nas propriedades de resistência flexural e resistência ao impacto dependente da concentração do antimicrobiano.

Outro composto que tem sido incorporado a materiais odontológicos, como a resina acrílica e reembasadores, é o dióxido de titânio (TiO_2) (AKIBA et al., 2005; SHIBATA et al., 2007). O TiO_2 libera radicais livres quando ativado por luz ultravioleta, decompondo material orgânico e bactérias presentes em sua superfície. Esse produto tem sido utilizado no tratamento da água, purificação de ar e como composto de auto-limpeza. É um material inorgânico, de custo baixo, não tóxico, que apresenta estabilidade física e química. Suas características fazem dele um agente químico interessante para a terapia fotodinâmica da estomatite protética.

Akiba et al. (2005) incorporaram TiO_2 em diferentes concentrações a um agente de cobertura para condicionadores de tecido, normalmente utilizado para diminuição de formação de biofilme sobre os mesmos. Foram avaliados os efeitos antifúngicos dessa incorporação sobre biofilme de *C. albicans*, após irradiação, bem como a degradação de proteínas que promovem o acúmulo de micro-organismos. Embora a presença do TiO_2 tenha aumentado a viscosidade do agente de cobertura, sua aplicação convencional por meio de pincel continuou possível. A viabilidade da *C. albicans* diminuiu significativamente tanto com o aumento da concentração de TiO_2 , quanto com o aumento do tempo de irradiação. Por meio de MEV, pode-se observar a diferença morfológica entre as células antes e após irradiação, indicando desnaturação da parede celular. A degradação das proteínas envolvidas no acúmulo dos micro-organismos foi maior no grupo de maior concentração de TiO_2 . Pela necessidade de aplicação de luz para ativação do composto, os autores apontam que agentes de cobertura para reembasadores contendo o TiO_2 não exercem efeito antifúngico na cavidade bucal podendo, entretanto, ser efetivos para a manutenção dos condicionadores de tecido quando as dentaduras são removidas, durante o período de sono.

Shibata et al. (2007) incorporaram TiO_2 e o TiO_2 coaptado com apatita (Ap- TiO_2) em uma resina acrílica para base protética e investigaram os efeitos antifúngicos desse material frente à *C. albicans*. Foi avaliada a atividade fungicida tanto dos dois compostos isolados, quanto dos compostos incorporados ao material acrílico. Em suas formas isoladas, ambos os compostos apresentaram forte atividade antifúngica, sem diferença significativa entre eles. Os espécimes em resina acrílica foram confeccionados incorporando TiO_2 ou Ap- TiO_2 , nas concentrações de 1, 5 e 10%. Foi encontrada diminuição significativa da viabilidade celular para os grupos contendo 5 e 10% de ambos os compostos. Ao ser avaliada a resistência a flexão dessa resina acrílica, foi encontrado diminuição desses valores com o aumento da concentração desses produtos. Alguns grupos não atingiram os valores recomendados pela norma ISO 1567 (> 65 MPa). Apesar de o módulo flexural também ter variado, os valores permaneceram dentro dos limites da mesma norma (> 2000 MPa). Os autores relacionaram a diminuição desses valores a uma possível alteração do grau de conversão da resina acrílica pela presença dos produtos, aumentando a quantidade de monômero residual, levando a um efeito plastificante. Frente aos resultados dos testes biológicos e físicos, os autores sugerem que adição desses compostos na concentração de 5% pode exercer efeito antifúngico sobre *C. albicans* e manter propriedades mecânicas adequadas para o uso clínico do material.

Dentre os fatores intimamente relacionados a adesão de *C. albicans* à superfície da resina acrílica, destacam-se as forças eletrostáticas e hidrofóbicas, como as forças de van der Waals (WEBB et al., 1998). Assim, uma forma de reduzir a adesão dessas leveduras à superfície do polímero seria a incorporação de radicais polares na matriz polimérica, que seriam capazes de aumentar sua hidrofília (PURI et al., 2008). Park, Periathamby e Loza (2003) avaliaram o efeito da incorporação de radicais carregados negativamente a uma resina acrílica para base de prótese sobre a adesão de *C. albicans*. Foi incorporado ácido metacrílico aos espécimes em resina acrílica nas concentrações de 5%, 10% e 20% (em volume). Após imersão em água para eliminação do monômero residual, os espécimes foram esterilizados e incubados em uma suspensão de *C. albicans*. Após incubação, os espécimes foram removidos, lavados para haver desprendimento das células fracamente aderidas e, por fim, os micro-organismos aderidos foram fixados e corados. Por meio de microscopia óptica, a superfície dos espécimes foi examinada e o número médio de colônias de *C. albicans* foi calculado. Os resultados mostraram correlação significativa entre a quantidade de ácido metacrílico incorporado e a adesão de *C. albicans*, onde o aumento dessa concentração promoveu uma diminuição na adesão. Os autores demonstraram o papel das interações eletrostáticas na adesão microbiana e apresentam um método efetivo de reduzir a adesão de *C. albicans* à superfície da resina acrílica testada por meio da modificação da carga elétrica superficial do material.

A incorporação de radicais polares para modificação da superfície de materiais acrílicos tem se mostrado promissor na obtenção de biomateriais que promovam a diminuição da adesão de micro-organismos. Apesar disso, sua influência nas propriedades físicas dos materiais aos quais foram incorporados precisava ser investigada. Dhir et al. (2007) incorporaram um monômero experimental contendo radicais fosfato a uma resina acrílica para base de prótese e investigaram as propriedades físicas desse material. Os espécimes foram obtidos com adição do composto nas concentrações de 10 e 20% em volume e as propriedades de resistência e módulo flexural, sorção de água, solubilidade e estabilidade de cor foram avaliadas. Diferença significativa para a resistência flexural foi encontrada, havendo uma diminuição de 5,25% desse parâmetro no grupo 10%, e de 10,4% no grupo de maior concentração. Com relação a estabilidade de cor, estatisticamente não houve diferença significativa entre os grupos. Houve aumento na sorção de água e na solubilidade para o grupo com 20% do monômero. Embora visualmente imperceptível, os valores de alteração de cor para o grupo com maior teor do composto foram maiores quando comparados ao grupo

controle. Frente a esses resultados, os autores indicam a incorporação desses radicais fosfatos à resina acrílica testada até a concentração de 10%, sem alterar clinicamente as propriedades requeridas para serem utilizados na confecção de base de prótese.

Park et al. (2008) investigaram o efeito da presença de radicais polares numa resina acrílica para base de prótese, bem como a aplicação de um polímero auto-adesivo na redução da adesão de *C. albicans*. Foram confeccionados espécimes contendo ácido metacrílico na concentração de 16%, e outro com aplicação do polímero auto-adesivo na superfície de cada espécime. Esses foram incubados em suspensão de *C. albicans* por 2, 4, 6 ou 12 dias. Após incubação, os espécimes foram removidos, lavados para haver desprendimento das células fracamente aderidas e, por fim, os micro-organismos aderidos foram fixados e corados. Por meio de microscopia óptica, a superfície dos espécimes foi examinada e o número médio de células de *C. albicans* aderida foi calculado. Com até dois dias de incubação, a resina contendo ácido metacrílico apresentou menor nível de adesão de *C. albicans* em comparação com os grupos não modificados ou que receberam aplicação do polímero auto-adesivo. Após 4, 6 e 12 dias de incubação, comparado ao grupo não modificado, a adesão fúngica foi significativamente menor nos outros grupos.

Park et al. (2009) avaliaram as propriedades mecânicas de uma resina acrílica contendo ácido metacrílico nas concentrações de 5, 10 e 20% (em volume). Os autores avaliaram força e deflexão transversas, resistência a flexão e módulo de elasticidade. Para essas propriedades, observaram-se menores valores com o aumento da concentração do ácido metacrílico na matriz do polímero. Os autores concluíram que a modificação da resina acrílica com ácido metacrílico muda as propriedades físicas da resina, entretanto, na concentração de 5%, as propriedades permaneceram semelhantes às do material comercialmente disponível.

Outra solução sugerida para a prevenção da adesão microbiana a materiais poliméricos é a aplicação de agentes de cobertura, também à base de polímeros, que atuam dificultando a ligação e o crescimento microbiano nesses materiais, por tornarem a superfície da resina acrílica mais lisa, diminuindo o acúmulo de alimentos e adesão de placa e melhorando as condições de higiene bucal. Com o intuito de avaliar o efeito de um glazeamento da superfície interna de próteses removíveis na formação de biofilme, Sesma et al. (2005) confeccionaram próteses parciais com cobertura total do palato para 10 indivíduos. Uma camada de *glaze* foi aplicada somente do lado direito da resina do palato. Todos os voluntários receberam as

mesmas instruções de higiene bucal e limpeza da prótese. Após o primeiro mês, fragmentos da resina do palato de ambos os lados, com e sem *glaze*, foram removidos para análise de formação da placa bacteriana. O mesmo procedimento foi realizado após 3 meses. Os espécimes foram preparados para análise em MEV. Após o primeiro mês, os fragmentos de resina acrílica glazeada apresentaram camada mais fina de placa bacteriana, com pequena quantidade de micro-organismos. O grupo não glazeado apresentou denso acúmulo de placa, rica em micro-organismos. Entretanto, após três meses, a superfície glazeada não se apresentava mais lisa, com pequenas imperfeições evidenciadas, o que propiciou aumento do acúmulo de placa.

Hirota et al. (2005) recobriram superfícies de polietileno com o polímero MPC (2-metacriloiloxietil fosforilcolina) e avaliaram os níveis de adesão de *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Após incubação dos espécimes em suspensões de cada microrganismo, o número de células aderidas foi contado por meio de microscopia de fluorescência. Para todos os micro-organismos, o número de células aderidas às amostras recobertas com o MPC foi significativamente menor quando comparado aos grupos sem cobertura. Outros espécimes foram fixados na superfície de próteses totais superiores e a colonização microbiana sobre esses fragmentos foi avaliada após 1 e 24 horas. Para ambos os períodos, o número de células aderidas foi bem menor para os fragmentos contendo a cobertura de MPC. Os autores atribuíram esses resultados à “super-hidrofilia” das superfícies recobertas pelo MPC, demonstrando ser essa uma estratégia promissora para a prevenção da retenção microbiana aos aparelhos biomédicos e a outras superfícies.

2.3 Agentes antimicrobianos copolimerizáveis

Os resultados dos trabalhos apresentados mostraram que grande parte dos compostos incorporados em materiais para bases de próteses removíveis são liberados com o passar do tempo, levando à perda das propriedades antimicrobianas do material. Além disso, dependendo da concentração na qual são incorporados, estes agentes podem afetar negativamente as propriedades físicas e mecânicas do polímero, bem como podem ser tóxicos aos tecidos bucais do paciente, se não forem adequadamente controlados (NOHR; MACDONALD, 1994).

Como estratégias alternativas, monômeros à base de sal de amônio quaternário têm sido desenvolvidos, os quais são capazes de integrarem-se covalentemente à cadeia dos polímeros. Sua ação se dá pelo contato dos micro-organismos com o biocida, e não pela liberação dos seus componentes, promovendo alteração no balanço eletrolítico da sua membrana celular, promovendo sua desorganização e, por fim, ruptura (THOMASSIN et al., 2007). Esses compostos têm sido amplamente utilizados em pinturas, tratamento de água e nas indústrias têxtil e alimentícia, devido à sua relativa baixa toxicidade e amplo espectro antimicrobiano (KOURAI et al., 2006), os quais se unem quimicamente às cadeias poliméricas por meio de radicais ativos, passando a integrar-se a matriz do material. Dentre as vantagens desses compostos, destacam-se não volatilidade, estabilidade química e baixa permeabilidade à pele (BEYTH et al., 2006).

Imazato et al. (1992) apresentaram um novo monômero, o brometo de metacriloiloxiundecilpiridínio (MDPB), sintetizado no intuito de conferir propriedades antibacterianas a compósitos restauradores. O composto possui acentuada atividade antimicrobiana e pode copolimerizar-se com outros monômeros. O efeito antimicrobiano desse monômero não depende da liberação dos seus componentes, mas age pelo contato direto do micro-organismo com os componentes imobilizados, presentes na superfície do compósito. Nesse estudo preliminar, os autores avaliaram o efeito inibitório do compósito contendo o MDPB nas concentrações de 0,1 e 0,2% em massa, sobre o crescimento de *S. mutans* e o acúmulo de biofilme sobre o compósito, bem como a eluição dos componentes antimicrobianos. Os métodos utilizados foram os de difusão em disco e HPLC. Os autores encontraram menor grau de acúmulo de biofilme para os espécimes contendo o MDPB e o crescimento de *S. mutans* no grupo contendo 0,2% do monômero foi reduzindo em

aproximadamente 99,2% comparado ao controle. Os resultados indicaram que o compósito contendo MDPB demonstraram, *in vitro*, significativa atividade antibacteriana e que compósitos antimicrobianos sem liberação dos seus componentes biocidas podem ser formulados.

Imazato et al. (1994) investigaram a atividade antimicrobiana do monômero brometo de metacrilóiloxidodecilpiridínio (MDPB) incorporado a um compósito odontológico, a eluição dos seus componentes antimicrobianos no meio, bem como sua influência nas propriedades mecânicas desse material. A concentração inibitória mínima (CIM) do composto não polimerizado frente a diversas espécies do gênero *Streptococcus* foi determinada através de diluições seriadas, sendo encontrado para o *S. mutans* o valor de 15,6 µg/ml, semelhante às demais espécies testadas, no entanto, bem menor quando comparado ao brometo de hidroxidodecilpiridínio (188,0 µg/ml), antes da combinação com o grupo metacrilóil, e semelhante ao triclosan (15,6 µg/ml). A eluição do material do compósito ao meio foi avaliada por meio de teste de difusão em disco, utilizando espécimes contendo 0,0 (controle), 0,1 e 0,2% de MDPB frente ao *S. mutans*. A ausência de formação de halos de inibição demonstrou que o material não era liberado do compósito, não inibindo, assim, o crescimento bacteriano ao redor dos espécimes. Entretanto, o crescimento bacteriano sob os espécimes foi inibido nos grupos teste, sendo maior no grupo 0,2%. Ao ser avaliado o efeito inibitório do MDPB sobre o acúmulo de biofilme nos espécimes, foram encontrados menores valores para os grupos contendo o produto, no entanto, sem diferença significativa entre ambas as concentrações. Mesmo após 90 dias de imersão dos espécimes em água, o acúmulo de biofilme ainda foi menor nos grupos teste em relação ao controle. No intuito de avaliar a liberação de MDPB não polimerizado à resina composta testada, foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com imersão dos espécimes em água, etanol 100% e *n*-heptano, após 1, 7, 30, 60 e 90 dias. Não foi encontrado produto não polimerizado em nenhum dos tempos analisados. Propriedades mecânicas foram avaliadas através de testes de força compressiva, tensões diametral e flexural, bem como o módulo flexural, após 1, 30, 60 e 90 dias de imersão em água. Só foi encontrada diferença significativa no módulo flexural para o grupo 0,2% após 1 e 30 dias, quando apresentou maiores valores em relação ao controle.

Imazato et al. (KURARAY COMPANY, 1995) patentearam, nos Estados Unidos, o MDPB e outros compostos quaternários de amônio capazes de gerar um polímero antimicrobiano, bem como os materiais resultantes desse processo. Suas aplicações práticas

envolvem próteses vasculares, pele artificial, curativos, cateteres, fios de sutura, produtos odontológicos, lentes de contato e cimento ortopédico. Nessa publicação, demonstram as propriedades antibacterianas de uma resina composta incorporando o MDPB, já demonstrada em estudos prévios (IMAZATO et al., 1992, 1993, 1994). No entanto, demonstraram que o uso de um composto quaternário de amônio sem o grupo metacrilato – como o cloreto de cetilpiridínio – gera um halo de inibição no material recém-manipulado e que as propriedades biocidas somem após um mês de imersão em água. Um teste preliminar foi conduzido com outros materiais, como as resinas acrílicas Acron (polimerizada por meio de microondas; GC) e Unifast (auto-polimerizável; GC), obtendo a proporção de 0,3 % (em massa) de MDPB. Espécimes discoides foram posicionados sobre meio de cultura contendo *S. mutans*, e observou-se que ambas as resinas, originalmente, não inibiram a formação de colônias. Com a incorporação do MDPB, o crescimento bacteriano foi inibido sob os espécimes quase totalmente, mas sem a formação de halo de inibição. A formação de depósitos de biofilme também foi inibida sobre os materiais. Todos esses efeitos permaneceram inalterados após um mês de armazenamento em água a 37°C. A incorporação de um composto não polimerizável, por sua vez, gerou inibição de crescimento e formação de biofilme à semelhança do MDPB, além de um halo de inibição, imediatamente após a confecção dos espécimes. No entanto, após um mês de imersão, esse tratamento resultou em ausência total de efeitos antibacterianos. Assim, é possível afirmar que o MDPB copolimeriza-se com resinas acrílicas comercialmente disponíveis, e depende desse processo para manter-se ativo por períodos prolongados. Ainda, caso a liberação ocorresse, poderia resultar em efeitos indesejáveis para as propriedades do material seriam prejudicadas, bem como para a microflora e tecidos orais.

Imazato et al. (1995) determinaram a atividade do MDPB na forma solúvel e insolúvel em água frente a várias espécies de estreptococos bucais e elucidaram seu mecanismo de atividade antimicrobiana. Suspensões de cada micro-organismo avaliado foram obtidas e adicionadas a soluções de homopolímero de MDPB nas concentrações 100µg/ml e 50 µg/ml, bem como de copolímero de MDPB com acrilamida (50:50), na concentração 100µg/ml. Após incubação por 2h a 37°C, alíquotas de 100µl foram semeadas em placas de Petri com meio ágar BHI, incubadas por 48h e o número de células viáveis contadas. Houve redução nesse número em todos os tipos de micro-organismos após incubação com MDPB homopolímero e copolímero, não havendo diferença entre as concentrações de 100µg/ml e 50 µg/ml. Para avaliação na forma insolúvel, espécimes de resina composta fotopolimerizável foram confeccionados, adicionando MDPB nas concentrações 0,0 e 20% e incubados em

suspensões dos mesmos micro-organismos por 4h a 37°C. O mesmo protocolo para contagem de células viáveis foi realizado. A adesão de micro-organismos ao compósito com MDPB também foi avaliado, sendo encontrada uma redução significativa nos grupos teste. Os autores afirmam que o MDPB, na sua forma solúvel, atua penetrando na parede celular microbiana, sendo mais ativo contra o micro-organismo. Na forma polimerizada, o MDPB teria um efeito bacteriostático promovido pelo contato da célula com a superfície do compósito contendo o composto antimicrobiano, e, se prolongado, promoveria um efeito bactericida. No entanto, os autores conferem ao MDPB polimerizado ao compósito um importante efeito em diminuir a adesão de biofilme bacteriano.

Imazato et al. (1997) investigaram a atividade antimicrobiana de um *primer* dentinário contendo o MDPB antes de ser polimerizado, bem como a influência dessa incorporação na força de união com a dentina e no comportamento de cura desse sistema adesivo. Para avaliação da eluição do MDPB presente no *primer* dentinário, suspensões de *S. mutans*, *A. viscosus* e *L. casei* foram cultivadas, semeadas em placas de Petri com ágar BHI, e discos de papel contendo o *primer* impregnado com o MDPB foram posicionados e, após incubação por 48h a 37°C, as zonas de inibição foram medidas. O composto antimicrobiano foi adicionado ao *primer* da marca comercial LB em 3 diferentes concentrações: 1, 2 e 5%, e estes foram comparados com outros dois *primers* – Scotchbond Multi-Purpose e Tripton Dentin. Os grupos contendo MDPB demonstraram inibição contra todas as espécies utilizadas, apresentando maiores zonas de inibição. O diâmetro das zonas crescia com o aumento da concentração de MDPB. Para avaliar a atividade bactericida, 100µl de cada *primer* foi inoculado em 900µl de suspensão de *S. mutans* e, a partir daí, diluições seriadas foram realizadas e, após incubação em placas de Petri, o número de células viáveis foi determinado pela contagem do número de colônias. Os grupos contendo o MDPB obtiveram os menores valores de contagem de colônias, e esse número era menor à medida que a concentração do antimicrobiano aumentava.

Imazato et al. (1998a) investigaram o efeito inibitório de um *primer* dentinário contendo MDPB contra bactérias orais após a cura. Para confecção dos espécimes, foi utilizado o *primer* LB como controle e, para o grupo experimental, adicionado MDPB a 5%. Foi avaliado o efeito inibitório desse *primer* no crescimento microbiano frente às espécies *S. mutans*, *A. viscosus* e *L. casei*. Placas de Petri com ágar BHI foram inoculadas com alíquotas de cada espécie microbiana, os espécimes posicionados, e a eluição do MDPB estimado pela

produção de zonas de inibição ao redor dos espécimes. Não houve eluição do material evidenciada pela ausência de halos de inibição para todos os grupos. Após essa análise, os espécimes foram removidos e atribuídos escores ao grau de crescimento microbiano sob os mesmos, bem como nas superfícies do ágar em contato. Para todas as espécies, as médias dos escores atribuídos ao grupo experimental foram menores em relação ao controle. Para avaliar a atividade bactericida, 50µl de suspensão de *S. mutans* foi posicionado na superfície correspondente ao *primer* do espécime e, após incubação, células foram recuperadas em caldo BHI por meio de agitação vigorosa dos espécimes. A partir dessa suspensão, diluições seriadas foram realizadas e plaqueadas, onde, após incubação, o número de células viáveis foi determinado pela contagem das colônias. Diferença significativa foi encontrada na quantidade de UFC/ml, sendo os valores bem menores após o contato com o MDPB. A análise da eluição do MDPB não polimerizado dos espécimes utilizou-se a técnica do HPLC. Entretanto, nada foi encontrado, mesmo após 1 hora de contato do líquido analisado com os espécimes.

Imazato et al. (1998b) determinaram o efeito antibacteriano de uma resina composta a base de bisfenol A diglicidileter metacrilato (Bis-GMA) contendo MDPB e MDP (fosfato de dihidrogênio methacrililoiloxidecil), frente ao *S. mutans*. Foi realizado um teste de difusão em disco com espécimes contendo as substâncias testadas na concentração de 2:1 em relação aos monômeros trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) e Bis-GMA presentes na composição da resina utilizada. A ausência de halos de inibição demonstrou que o material não era liberado da resina composta, não inibindo, assim, o crescimento bacteriano ao redor dos espécimes. Entretanto, a esta inibição foi conseguida sob os espécimes do grupo teste. Aliquotas de uma suspensão do micro-organismo foram colocadas em contato com a superfície dos espécimes, incubados e após diluição seriada dessa suspensão em meio de cultura, foi determinado o número de células viáveis pela contagem do número de colônias. Quando comparados com o controle, o crescimento bacteriano foi fortemente inibido pelos espécimes contendo o MDPB/MDP. Para avaliação da atividade bactericida, os espécimes polimerizados foram imersos em suspensões do micro-organismo e, após incubação, alíquotas foram semeadas em placas de Petri para posterior contagem do número de colônias formadas. Não houve diferença significativa para o número de UFC/ml entre os grupos. Esses resultados apontam para um maior efeito bacteriostático da resina composta contendo MDPB/MDP. Sobre o acúmulo de biofilme, o efeito inibitório encontrado foi significativamente maior para o grupo experimental. Esses resultados demonstram também que a adição dessas substâncias à

resina composta pode contribuir para a prevenção de cárie secundária entre dente e material restaurador.

Imazato et al. (1999) determinaram a concentração bactericida mínima (CBM), a cinética bactericida do MDPB frente a sete diferentes tipos de *Streptococcus* bucais, bem como investigaram a citotoxicidade do MDPB não-polimerizado em células pulpare humanas. Não houve diferença entre os valores de CBM para as espécies, que variaram de 31.3-62.5µg/ml. Quando comparado ao cloreto de cetilpiridínio, cuja CBM varia de 1-8 µg/ml, o MDPB apresenta uma atividade bactericida inferior. Para determinação da cinética bactericida, MDPB em solução foi adicionado a suspensões de *S. mutans* até concentrações finais de 100, 250, 500µg/ml ou 1,0mg/ml. Após 1, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos de incubação, foi realizado teste de diluição seriada para obtenção do número de células viáveis pela contagem de colônias bacterianas. Concentrações acima de 500µg/ml mataram 99,9999% das bactérias após 1 minuto de contato e, na concentração de 250µg/ml, após 5 minutos, indicando uma rápida ação bactericida. A citotoxicidade foi avaliada através da captação de 3H-timidina depois do contato das células pulpare com soluções de MDPB nas concentrações de 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 e 0.1µg/ml. A viabilidade celular foi pouco influenciada nas concentrações abaixo de 40µg/ml, acima da qual efeito citotóxico foi claramente observado. Assim, concentrações necessárias para que o antimicrobiano tenha efeito bactericida apresentariam efeito citotóxico considerável. No entanto, os autores apontam a necessidade de outros estudos para avaliar esse real efeito, tendo em vista as limitações dos estudos in vitro.

Imazato et al. (2000) investigaram os efeitos citotóxicos, em células pulpare humanas, de compósitos utilizando *primers* experimentais (PE) contendo MDPB, bem como a difusibilidade dos componentes do monômero. Os PEs foram obtidos a partir da adição de MDPB aos *primers* dos sistemas adesivos Clearfil Liner Bond 2 e Panavia 21, nas concentrações finais de 1, 2 ou 5%, e foi comparada a citotoxicidade dos *primers* entre si. Os sistemas adesivos foram aplicados em espécimes de dentina humana, e após a difusão sobre células pulpare, não foi encontrada diferença para a citotoxicidade entre os grupos controle e experimentais para ambos os sistemas. Assim, a incorporação do MDPB até a concentração de 5% não aumenta o efeito citotóxico do produto comercial original. Por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), foi avaliada a difusão de componentes monoméricos dos *primers* testados, no intuito de se estimarem os componentes responsáveis

pela citotoxicidade do material. Para ambos os sistemas, foi detectada a liberação de quantidades consideráveis de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), não havendo diferença do controle para os grupos experimentais, em ambos os tipos de adesivo. Foi detectada a presença de MDPB difundido apenas nos grupos contendo 2 e 5% do composto; no entanto, sua concentração foi muito aquém da mínima necessária para exercer influência na viabilidade celular.

Ebi et al. (2001) avaliaram o efeito de uma resina composta contendo o MDPB na concentração de 2,83% no acúmulo de biofilme por *S. mutans*. Não foi detectada a eluição de componentes antimicrobianos do MDPB a partir da resina composta por meio da técnica de HPLC. Foi determinada, in vitro, a inibição de acúmulo de biofilme por *S. mutans*, com ou sem tratamento com saliva. Em ambos os grupos, tratados com saliva ou não, o acúmulo de biofilme foi significativamente inferior para o grupo experimental quando comparado ao controle. Também foi avaliado o efeito inibitório do compósito experimental na formação de glucanos, crescimento e união do *S. mutans* na superfície da resina acrílica. Após 24h de incubação, redução significativa foi encontrada, para os três fatores, para o grupo experimental. A avaliação das medidas de rugosidade superficial e ângulo de contato não mostraram ser influenciados pela presença do MDPB. Esses resultados apontam para a viabilidade do uso clínico desse compósito, demonstrando efetiva atividade anti-biofilme.

Imazato et al. (2001) investigaram a atividade antimicrobiana de um *primer* contendo MDPB contra bactérias presentes em dentina humana cariada, removida diretamente da cavidade bucal de pacientes. Foi determinada a CIM e a concentração bactericida mínima (CBM) do composto antimicrobiano, por meio de testes de diluição em caldo, frente a 11 espécies bacterianas presentes na dentina cariada. Foram testados 3 *primers* diferentes (Liner Bond 2, Scotchbond Multi-Purpose Primer e Bondwell LC Primer) e um experimental obtido com a adição de MDPB na concentração final de 5%. Os autores relatam que uma comparação dos valores obtidos com os de outros antimicrobianos indica que o MDPB tem uma forte habilidade de inativar e matar bactérias anaeróbias. Para avaliar a atividade antimicrobiana intrínseca do *primer*, suspensões foram preparadas a partir de fragmentos de tecido cariado removido de dentes humanos in vivo, das quais alíquotas foram removidas, plaqueadas, incubadas e a quantidade de células viáveis determinadas por meio da contagem das colônias formadas. Alíquotas da suspensão de cada micro-organismo foram colocadas em contato com todos os *primers* testados, por 30s, em diluições de 2, 20, 40 e 100 vezes. Após

esse tempo, alíquotas eram plaqueadas, incubadas e o número de células viáveis determinadas. O *primer* experimental foi o que apresentou maior atividade bactericida, matando completamente os micro-organismos nas diluições de 2, 20 e 40 vezes. Mesmo na diluição de 100 vezes, seu efeito bactericida foi bem significativo quando comparado aos demais *primers* comerciais.

Imazato et al. (2002) investigaram a habilidade de um adesivo experimental contendo MDPB de penetrar em lesões cariosas artificiais, bem como seu efeito bactericida contra bactérias presentes em dentina desmineralizada. O adesivo experimental foi obtido em 3 diferentes concentrações de MDPB (1, 2 e 4%) e foi comparado a outros três sistemas adesivos comerciais (Prime e Bond 2.1, Single Bond e Liner Bond 2 – LB 2). Foram induzidas lesões cariosas nas raízes de dentes humanos e os sistemas adesivos aplicados sobre a região, para avaliação da penetração do agente adesivo. Depois dos cortes terem sido devidamente realizados, a profundidade de penetração do agente adesivo foi analisada por meio de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM), com aumento de 40 vezes. Não foi observada diferença significativa no grau de penetração de todos os adesivos testados, indicando que o MDPB não influencia na capacidade do *primer* de impregnar a dentina desmineralizada. Para avaliar a atividade antibacteriana, foram utilizados blocos de dentina de humano devidamente desmineralizada e colonizada com cepas de *S. mutans* e *Lactobacillus casei* em suspensão. Após, os agentes adesivos foram aplicados nos blocos, cortados em pedaços menores, homogeneizados em PBS, diluídos em meio de cultura, a partir do qual, alíquotas foram inoculadas em placas com ágar. Após incubação, o número de células viáveis foi determinado pela contagem de colônias formadas. Dentre as marcas comerciais, o LB 2 apresentou maior efeito bactericida. A contagem de colônia foi bem menor nos grupos de adesivos experimentais. Para ambas as bactérias, não houve diferença entre o LB 2 e o adesivo contendo 1% de MDPB, bem como entre os grupos contendo 1% e 2% de produto microbiano. Por não ter havido formação de colônias para ambas as bactérias no grupo contendo 4% de MDPB, os autores indicam que a aplicação de um *primer* contendo o antimicrobiano nessa concentração seria um método útil para desinfecção e dentina do interior de lesões cariosas.

Imazato et al. (2003) investigaram a atividade antibacteriana de um adesivo resinoso (LB Bond) contendo o MDPB a 2,5% contra *S. mutans*, suas características adesivas em relação a força de união à dentina, bem como sua capacidade de cura. Após aplicação da

camada de adesivo numa superfície dos espécimes em resina composta e fotoativação, os mesmos foram esterilizados e alíquotas de 100µl de suspensão de *S. mutans* foram inoculadas nessa superfície. Após período de incubação, os espécimes foram agitados em meio de cultura BHI, diluições seriadas realizadas e alíquotas de 100µl plaquedas para posterior contagem da UFC/ml. Foi encontrada redução significativa de células viáveis para o grupo experimental quando comparado ao grupo controle. Não houve influência negativa sobre a força de união entre o adesivo e o compósito, bem como na capacidade de cura do adesivo. Esses resultados aliados aos achados microbiológicos satisfatórios, indicam a eficácia desse sistema adesivo com atividade antibacteriana no seu desempenho clínico.

Pesci-Bardon et al. (2004) avaliaram as propriedades antissépticas de uma resina acrílica para base de prótese contendo um composto polimérico a base de amônio quaternário, o Poly 202063A, frente aos micro-organismos *S. aureus*, *Escherichia coli* e *C. albicans*, bem como a estabilidade desse composto após polimerizado à resina acrílica. O Poly 202063A é um composto de amônio carregado positivamente que atrai micro-organismos e atua danificando suas membranas celulares. A cadeia de carbono presente em sua molécula funciona como espaçadores, que tornam os radicais catiônicos disponíveis na superfície do material. Os grupos experimentais continham 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50% de relação pó/pó com a resina acrílica. Os espécimes confeccionados foram imersos em saliva artificial estéril por 4 semanas. Foi realizado um protocolo de diálise, onde pequenos volumes de inóculo simulavam o biofilme protético. Para cada concentração, 1 espécime foi colocado em suspensão de cada micro-organismo, outro inserido em um recipiente contendo 600µl de suspensão microbiana e dialisados contra 45ml de PBS estéril e, por fim, um terceiro espécime inseridos em 600µl de de PBS estéril e dialisados contra 45ml de suspensão microbiana. Houve um efeito dose-dependente da concentração do Poly 202063A sobre as três espécies testadas, que foi mais intenso para o *S. aureus*. O uso de pequenas quantidades do inóculo tornou esse efeito mais evidente. Esse fato, associado à interferência quase insignificante com os micro-organismos fora da membrana de diálise, pode ser apontado como um indício da permanência do material na rede polimérica. Concluiu-se que a resina acrílica contendo o Poly 202063A a 2% demonstrou propriedades bactericidas e fungistáticas, que poderia possibilitar a obtenção de próteses removíveis com propriedades antissépticas intrínsecas.

Recentemente, foram apresentados polímeros a base de 2-tert-butilaminoetil metacrilato (TBAEMA) que, como o MDPB, quando copolimerizados, atuam como um biocida por contato (OTTERSBACH; KOSSMANN, 2002 apud SEYFRIEDSBERGER; RAMETSTEINER; KERN, 2006, p. 3384). Esses compostos são conhecidos pelo seu efeito contra um amplo espectro de micro-organismos, porém com baixa toxicidade para células humanas. Ignatova et al. (2006) avaliaram o recobrimento superficial do aço inoxidável usando-se diversos copolímeros de TBAEMA e seu efeito sobre a adesão de *S. aureus*. Os autores constataram que os grupos recobertos demonstraram redução da adesão desses micro-organismos na ordem de 3 a 4 vezes, bem como uma distribuição homogênea dos copolímeros pela superfície das amostras, evidenciado por microscopia de força atômica. Os autores realizaram esse estudo em aço inoxidável por ser amplamente utilizado em implantes ortopédicos e, quando acometidos por processos infecciosos, o principal patógeno isolado é o *S. aureus*.

Lenoir et al. (2006) incorporaram o poli(TBAEMA) a um polietileno de baixa densidade (LPDE) na concentração de 10% em massa e investigaram o efeito antimicrobiano nesse material frente a *Escherichia coli*, bem como a morfologia dessas células por meio de microscopia eletrônica de transmissão, antes e após contato com o material. O produto foi misturado após derretimento do polietileno. Análise espectroscópica mostra claramente a distribuição homogênea do composto pelo polímero e sua presença por toda a superfície, localização fundamental para ocorrer atividade antimicrobiana. Suspensões de polietileno misturado ao poli(TBAEMA) em soro fisiológico esterilizado foram obtidas nas concentrações de 0,2, 0,3 e 0,4 g/ml e alíquotas da suspensão do micro-organismo foram inoculadas nessas suspensões. Seguido tempo de incubação, diluições seriadas foram realizadas e feita contagem do número de colônias após plaqueamento dessas diluições. Os autores encontraram que a incorporação do poli(TBAEMA) no polietileno na concentração de 10% foi capaz de matar todas as bactérias quando em contato com o inóculo por 120 minutos, quando 0,4g do material modificado por milímetro de inóculo é utilizado. A observação microscópica os micro-organismos mostra claramente a destruição das membranas celulares.

OTTERSBACH, P.; KOSSMANN, B. Eine neue klasse von bioziden. **GIT Labor Fachzeitschrift**, v. 46, n. 4, p. 452-456, 2002.

Imazato et al. (2006) avaliaram a atividade antibacteriana do *primer* dentinário do sistema Clearfil Protect Bond, contendo o MDPB na concentração de 5%, comparando a outro *primer* contendo 1% de cloreto de cetilpiridínio (CCP) frente aos micro-organismos *S. mutans*, *L. casei* e *Actinomyces naeslundii*. Foi avaliada a influência de cada *primer* sobre o crescimento microbiano por meio de teste de difusão utilizando discos de papel impregnados com 20µl de cada *primer*. Por meio da mensuração das zonas de inibição, ambos os grupos contendo o MDPB e CCP inibiram o crescimento das três espécies, entretanto a ação do MDPB foi significativamente maior. As concentrações inibitórias e bactericidas mínimas do *primer* contendo o MDPB foram bem menores para *S. mutans* e *L. casei* quando comparadas aos demais grupos. Ao avaliarem o efeito bactericida dos compostos em dentina humana contaminada por *S. mutans*, in vitro, não foi evidenciado formação de colônias bacterianas no grupo contendo MDPB. Os autores concluíram que o Clearfil Protect Bond, sistema adesivo dentinário contendo MDPB em sua composição, possui forte atividade antibacteriana contra *S. mutans*, *L. casei* e *A. naeslundii*, bem como capacidade de promover antisepsia de cavidades contendo bactérias residuais.

Pesci-Bardon et al. (2006) determinaram as propriedades antissépticas de espécimes confeccionados em resina acrílica para base de prótese incorporando um composto a base de amônio quaternário, o Poly 202063A, frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Os grupos experimentais continham 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50% de relação pó/pó com a resina acrílica. Os espécimes confeccionados foram imersos em saliva artificial estéril por 4 semanas. Como controle, 100µl da suspensão inicial e das diluídas (10^2 , 10^3 and 10^4), foram plaqueadas em para posterior contagem do número de UFC/ml. Dois protocolos foram realizados: incubação de parte dos espécimes em 15ml de suspensão de cada micro-organismo por 24h e outra parte em 600µl do inóculo. Após esse período, 100µl das suspensões contendo os espécimes foram plaqueados e incubados para posterior determinação do número de UFC/ml. Após a determinação das concentrações mínimas necessárias para inibir crescimento de cada micro-organismo estudado (2% para *E. coli*, *S. aureus*, 10% para *P. aeruginosa* e 50% para *C. albicans*, os autores concluíram que o novo composto presente na concentração de 2% confere propriedades antissépticas à resina acrílica estudada.

Seyfriedsberger, Rametsteiner e Kern (2006) investigaram um polietileno contendo poli(TBAEMA) nas concentrações 1,5, 3 e 5% em massa e investigaram a atividade antimicrobiana desse material frente a *S. aureus* e *E. coli*. O número de UFC/ml de *S. aureus*

após contato do micro-organismo com os grupos experimentais por 24 horas foi reduzido a zero. Para *E. coli*, esse padrão de redução foi evidenciado para o grupo com concentração 5%. Entretanto, os grupos contendo o poli(TBAEMA) nas concentrações menores também promoveram redução no número de UFC/ml. Foram realizadas medidas eletrocinéticas e por meio do parâmetro “potencial zeta” avaliaram a presença de grupos amina na superfície do material. Foi encontrado um aumento desse parâmetro de acordo com o teor de poli(TBAEMA) no material. Também foi investigado o potencial de formação de biofilmes pelo material contendo o poli(TBAEMA) por meio do método de medida de tri-fosfato de adenosina (ATP) após incubação em água por 8, 12 e 16 semanas. Esse teste quantifica o número de micro-organismos presentes no biofilme aderido ao espécime. Biofilme só foi evidenciado após 12 e 16 semanas de incubação. Não houve alteração das propriedades mecânicas do material quando o poli (TBAEMA) está presente em até 5% de concentração.

Thomassim et al. (2007) incorporaram o poli(TBAEMA) a um polipropileno disponível comercialmente e avaliaram suas propriedades antimicrobianas frente a espécie *E. coli*. Os grupos experimentais foram obtidos incorporando o poli(TBAEMA) nas concentrações 12,5 e 25% em massa. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que o poli(TBAEMA) encontrava-se disperso homogeneamente por todo o polipropileno. Por meio de teste de contagem de células viáveis, os pesquisadores encontraram efetiva atividade antimicrobiana, cujo efeito demonstrou-se duradouro durante o período de tempo avaliado (0 a 150 minutos). Os autores conferem o efeito duradouro à característica de ligação do poli(TBAEMA) às cadeias poliméricas do polipropileno, o que impede a liberação desse produto ao longo do tempo.

Yoshikawa et al. (2007) testaram a capacidade do MDPB de inibir o crescimento de micro-organismos associados à lesões ativas de cárie, bem como de modificar as características do crescimento desses micro-organismos em concentrações inferiores a sua CIM (sub-CIM). Os autores determinaram as CIM e CBM do MDPB frente a *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *A. naeslundii*, *A. israelii*, *A. gerensceriae*, *A. odontolyticus*, *L. spp.* e *C. albicans*, e também o efeito de concentrações sub-CIM na cinética do crescimento microbiano. O MDPB apresentou efeito inibitório sobre todas as espécies. Foi avaliado igualmente o efeito do pH na atividade antimicrobiana do MDPB frente a *L. spp.* e *C. albicans*, encontrando inibição mais expressiva quando em pH ácido. Mesmo em concentrações sub-CIM, o crescimento de todos os micro-organismos foi significativamente reduzido. Baseado

nesses resultados, o MDPB demonstrou potencial de inibir o crescimento da microbiota associada a lesões ativas de cárie.

Imazato et al. (2008) investigaram o efeito bactericida do MDPB frente ao *S. mutans* por meio de um método de coloração de células viáveis, comparando os resultados com aqueles obtidos por um método convencional de contagem de células viáveis. Foi utilizado o kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability, que cora as bactérias vivas com membranas intactas em verde e as células mortas com membranas rompidas em vermelho, e essas observadas por meio de microscopia for fluorescência. A proporção de células vivas e mortas foi contada após 10, 20 e 30 minutos de contato dos micro-organismos com o MDPB, nas concentrações de 250, 100, 50 e 10µg/ml. Para realização do método convencional, diluições decimais seriadas foram realizadas após os três períodos de contato mencionados. Uma alíquota de 100µl inoculadas em placas contendo ágar BHI e, após incubação, o número de colônias contadas. Para o primeiro teste, a diminuição da concentração de MDPB resultou em aumento significativo de células vivas, entretanto, mesmo na concentração menor, foi observado 24% de células mortas. A proporção de células vivas e mortas, ao início do teste era de, aproximadamente, 1,8-1,9. Após 10 minutos de contato com a concentração de 250µg/ml, essa razão caiu para aproximadamente 0. Na concentração de 100µg/ml houve redução significativa nessa proporção, chegando a aproximadamente 0,1 após 30 minutos. Para as demais concentrações, redução foi observada, porém menor quando comparada a proporção de 100µg/ml. No teste de contagem de células viáveis, a morte celular foi dependente da concentração de MDPB, com um efeito mais rápido depois do contato na concentração maior, por 10 minutos. Os autores concluíram que o método de coloração de células viáveis é confiável, provendo valores rápidos e sensíveis em relação ao método convencional de contagem de células viáveis.

Korkmaz et al. (2008) avaliaram o efeito antibacteriano de diferentes sistemas de *primer*/adesivo auto-condicionantes, de um ou dois passos, frente aos micro-organismos *S. mutans*, *L. casei* e *L. acidophilus*. O Clearfil Protect Bond, contendo o MDPB em sua composição, foi um dos sistemas testados. Foi realizado teste de difusão em disco, em placa de Petri contendo cada micro-organismo, onde os diâmetros das zonas de inibição de crescimento fora medidos. Constatou-se que, dentre os sistemas testados, o Clearfil Protect Bond Primer, contendo o MDPB, foi o mais potente contra *L. acidophilus* and *L. casei*.

Xiao et al. (2008) sintetizaram três monômeros a base de sal de amônio quaternário, o cloreto de metacriloxietilbenzildimetil amônio (DMAE-BC), cloreto de metacriloxietil-m-cloro-benzildimetil amônio (DMAE-m-CBC) e o metacriloxietil cetil amônio (DMAE-CB), e avaliaram, *in vitro*, sua atividade antibacteriana frente a *S. mutans*, *S. aureus*, *A. viscosus* e *L. casei*. Por meio do método de diluição em caldo, foram determinadas as CIM e CBM dos três monômeros frente às espécies estudadas. Por ter sido o DMAE-CB o que apresentou melhor efeito antimicrobiano com os menores valores de CIM (1.2-4.8 µg/ml), os autores investigaram a cinética bactericida desse monômero frente a *S. mutans* e evidenciaram que, quando em com uma concentração 4 vezes maior que a CBM, houve morte imediata de 99,4% dos micro-organismos. Após 10 min de contato, 100% de morte celular foi obtida. Com esses resultados, os autores apontam que o monômero DMAE-CB é passível de ser utilizado em materiais restauradores odontológicos.

Li et al. (2009) avaliaram um novo monômero antibacteriano, o cloreto de metacriloiloxicetildimetil amônio (DMAE-CB), polimerizado ao adesivo dentinário Single Bond 2, e utilizou o Clearfil Protect Bond contendo o MDPB como controle positivo. Por meio do método de contato com filme de celulóide, foi avaliado o efeito do adesivo sobre o crescimento de *S. mutans*, antes e após envelhecimento dos espécimes. Foi encontrada uma diminuição do crescimento bacteriano para os grupos contendo ambos os monômeros, quando comparados ao controle, sem monômero. Entretanto, não houve diferença significativa entre o número de colônias de *S. mutans* para os dois monômeros, bem como o envelhecimento não influenciou no crescimento bacteriano, demonstrando o efeito duradouro de ambos os monômeros. A presença de eluentes dos adesivos numa suspensão contendo os micro-organismos não promoveu inibição do crescimento bacteriano, sendo essa avaliação feita por meio da medida de absorbância da suspensão, em espectrofotômetro. Esse resultado demonstra que o efeito antibacteriano não pode ser conferido a componentes bioativos liberados no meio. A adesão de *S. mutans* sobre o adesivo polimerizado, bem como a integridade da sua membrana foi avaliada por meio de CLSM e indicadores de fluorescência, onde as células de membrana íntegra foram coradas em verde e as de membrana danificada, em vermelho. Os espécimes do controle negativo estavam densamente povoados pelo micro-organismo, com predomínio de células coradas em vermelho. Os demais grupos apresentaram quantidade estatisticamente menor de células aderidas em sua superfície quando comparado ao controle negativo, sendo que o grupo do MDPB apresentou maior quantidade de células

aderidas. Entretanto, não houve diferença quanto ao padrão de dano a membrana celular do micro-organismo quando comparado o grupo teste ao controle positivo.

Agentes antimicrobianos à base de prata, efetivos contra um amplo espectro de micro-organismos, têm sido empregados como estratégia alternativa para reduzir a adesão microbiana e prevenir a formação de biofilme. Monteiro et al. (2009), em uma revisão sobre polímeros contendo prata, abordou as diversas formas de apresentação da prata como agente antimicrobiano, bem como seu mecanismo de ação contra diferentes micro-organismos. A primeira forma apresentada é a combinação com zeólitos, onde o autor destaca sua utilização na odontologia e apresenta os resultados de alguns autores como Kawara et al. (2000) e Casemiro et al. (2008), previamente abordados nesta revisão. As nanopartículas de prata, partículas insolúveis menores que 100nm, são apresentadas como uma outra forma de agregar prata a materiais com necessidade de propriedades antimicrobianas. Os autores apresentam inúmeras pesquisas comprovando a eficácia antimicrobiana desse material e destacam trabalhos realizados em materiais dentários, indicando sua incorporação em resinas acrílicas a base de PMMA utilizadas na confecção de próteses removíveis, prevenindo estomatite protética em usuários desses aparelhos. O mecanismo de ação da prata é descrito como uma forte união a grupos doadores de elétrons em moléculas biológicas contendo enxofre, oxigênio e nitrogênio, resultando em defeitos na parede celular bacteriana, com perda do seu conteúdo celular, alterando metabolismo e funções vitais, como a permeabilidade e a respiração. Também, interação com DNA celular pode ser encontrada, evitando a reprodução do micro-organismo. Os autores apontam que, devido a diferenças entre a parede celular, as espécies gram-positivas são geralmente menos susceptíveis ao agente antimicrobiano que as espécies gram-negativas. Os autores concluem que as formas apresentadas da prata na revisão constituem biomateriais efetivos que podem ser utilizados em uma grande variedade de aplicações, mas apontam para a necessidade de mais estudos que investiguem a liberação dos íons de prata de acordo com a necessidade de cada material, bem como mecanismos de união entre a prata e a matriz polimérica para criar materiais biocidas efetivos.

Paleari (2009) investigou a união química entre o TBAEMA e a matriz de uma resina acrílica, a presença dos grupos amina na superfície dos espécimes, bem como os efeitos dessa incorporação sobre a resistência flexural e a temperatura de transição vítrea da resina acrílica testada. Os espécimes foram confeccionados com diferentes concentrações de TBAEMA (0, 0,5%, 1%, 1,5%, 1,75%, 2%) incorporado ao monômero. Por meio de espectroscopia de

infravermelho por transformada de Fourier, evidenciou-se copolimerização entre a resina acrílica e o TBAEMA. O teste de espalhamento superficial de elétrons com análise química permitiu que fossem encontrados grupos amina espalhados pela superfície do material. Entretanto, a temperatura de transição vítrea avaliada pelo teste de calorimetria diferencial de varredura e a resistência flexural foram adversamente afetadas após a incorporação do TBAEMA.

2.4 Citotoxicidade dos polímeros odontológicos

Materiais poliméricos como as resinas acrílicas, compósitos restauradores, adesivos e *primers* dentinários podem liberar componentes como o MMA, formaldeído, ácido metacrílico, ácido benzóico, Bis-GMA, HEMA, TEGDMA e UDMA, os quais podem causar reações adversas na mucosa bucal adjacente aos aparelhos protéticos, bem como mudanças patológicas pulpares adjacentes às restaurações (JORGE et al., 2004; RATANASATHIEN et al., 1995).

A biocompatibilidade desses materiais tem sido avaliada por meio de estudos em animais, observações clínicas e culturas de células, os quais são considerados relativamente simples, reproduzíveis, efetivos e controlados. Entretanto, os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas, não podendo ser extrapolados para seres humanos (COSTA, 2001).

Hanks et al. (1991) determinaram as concentrações citotóxicas de 11 componentes presentes nas resinas compostas em linhagem celular permanente de fibroblastos de rato - Balb/c 3T3. Foram avaliados o efeito inibitório desses compostos nas sínteses de DNA e proteína, bem como se esses efeitos eram reversíveis quando os componentes foram removidos do meio. Para todos os componentes avaliados, foram encontradas semelhanças entre os valores de IC50, para os parâmetros metabólicos avaliados, bem como para as médias de irreversibilidade. Dentre os compostos, estudados, foram encontrados valores de IC50 de 0,0067 mg/ml para o Bis-GMA, 0,0059 mg/mL para o UDMA e 0,0189 mg/mL para o TEGDMA, sendo o bisfenol-A dimetacrilato etoxilado (Bis-EMA) a molécula mais tóxica do grupo. As concentrações cujas células e tecidos são expostas *in vivo* não são conhecidas, entretanto, os autores apontam os resultados do presente estudo importantes para a especulação das concentrações dos componentes orgânicos que representariam riscos clínicos.

Ratanasathien et al. (1995) investigaram a citotoxicidade de 4 componentes presentes em adesivos dentinários, HEMA, Bis-GMA, TEGDMA e UDMA, isoladamente, por meio do teste MTT onde fibroblastos Balb/c 3T3 foram expostas aos monômeros por 24 e 72 horas, bem como o efeito da interação desses em diferentes combinações – HEMA e Bis-GMA, Bis-GMA e TEGDMA, TEGDMA e UDMA. A comparação entre grupos foi feita por meio da determinação da concentração que causou 50% da redução da viabilidade celular (IC50),

cujos valores encontrados foram 0,468 mg/ml para o HEMA, 0,0048 mg/ml para o Bis-GMA, 0,0357 mg/ml para o TEGDMA e 0,0087 mg/ml para o UDMA. Para as três combinações as interações ocorreram na forma de sinergismo, aditivismo e antagonismo respectivamente, influenciados diretamente pela concentração dos componentes. O efeito citotóxico para todas as situações foi maior para o tempo de exposição mais prolongado. Assim, os autores apontam que tanto o tempo de exposição quanto a interação entre os componentes podem ser parâmetros na determinação da citotoxicidade desses monômeros *in vivo*.

Geurtsen et al. (1998) determinaram o efeito citotóxico de 35 monômeros e aditivos presentes em resinas compostas amplamente comercializadas. Os testes de citotoxicidade foram realizados em linhagem celular permanente de fibroblastos Balb/c 3T3 e em 3 tipos de fibroblastos primários derivados de tecidos humanos (gengiva, polpa e ligamento periodontal) e os valores de IC 50 determinados. Todas as substâncias foram testadas em concentrações variando de 0.01 to 5.0 mM. Entre os grupos de comonomeros, iniciadores e coiniciadores, severos (Bis-GMA, UDMA, DMBZ e DMDTA) ou moderados (HEMA, BEMA, CQ, DMPT e DMAPE), os efeitos citotóxicos puderam ser avaliados. Entre os grupos de produtos de reação/decomposição somente foram encontrados efeitos leves ou moderados. Dentre os monômeros testados, o inibidor BHT, o contaminante TPSb e o fotoestabilizador HMBP apresentaram-se citotóxicos a todas as culturas de células. Com os resultados encontrados, os autores apontam que alternativas menos citotóxicas estão disponíveis para muitos dos componentes presentes nos compósitos. Também, não houve tipo celular que se apresentou menos ou mais sensível aos efeitos tóxicos dos compostos testados de forma significativa, apesar da citotoxicidade ter sido mais expressiva nos fibroblastos primários humanos do ligamento periodontal e polpa em relação as demais.

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

3.1 *Objetivo Geral*

O objetivo deste trabalho foi investigar as propriedades biológicas do composto de amônio quaternário brometo de metacriloiloxiundecilpiridínio (MUPB), capaz de copolimerizar-se junto a outros monômeros de uso odontológico, para possível aplicação no controle do biofilme formado sobre próteses removíveis.

3.2 *Objetivos Específicos*

1. Determinar as concentrações inibitória e fugicida/bactericida mínimas do MUPB frente aos micro-organismos *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei* em comparação a outro composto de amônio quaternário;
2. Avaliar a citotoxicidade do MUPB em fibroblastos, comparando-o com o MMA;
3. Estudar a influência da incorporação do MUPB sobre a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica termopolimerizável, frente às espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*.

4. Material e Método

MATERIAL

Lista de material e aparelhos utilizados para realização dos testes descritos nessa seção.

- ✓ 11-bromo-1-undecanol, Sigma-Aldrich, Stanheim, Alemanha
- ✓ Ácido metacrílico, Sigma-Aldrich, Stanheim, Alemanha
- ✓ Agitador vortex, AP-56 Phoenix, Araraquara, SP
- ✓ Alças calibradas, Alfa, Alfa, São Paulo, SP, Brasil
- ✓ Cloreto de cetilpiridínio, Sigma-Aldrich, Stanheim, Alemanha
- ✓ Dimetil sulfóxido, VETEC, Química Fina, Duque de Caxias, RJ
- ✓ Embalagens para esterilização, VedaMax, São Paulo, SP, Brasil
- ✓ Espectrofotômetro, Labsystems Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Vantaa, Finlândia
- ✓ Fibroblastos de rato (L929), Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, BR
- ✓ Fresa, Mini-Cut, Malleifer SA, Ballaigues, Suíça
- ✓ Gentamicina, Indústria Química e Farmacêutica, Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro, RJ, BR
- ✓ Gesso pedra, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ
- ✓ Lixas d'água, Norton, Saint-Gobain Abrasivos Ltda., Guarulhos, SP
- ✓ Meio de cultura ágar *Sabourraud* dextrose, Himedia, Mumbai, Índia
- ✓ Meio de cultura *Brain Heart Infusion*, Himedia, Mumbai, Índia
- ✓ Meio de cultura *Tryptic Soy Broth*, Himedia, Mumbai, Índia
- ✓ Meio de cultura *Eagle*, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil
- ✓ Meio de cultura *Eagle* modificado por Dulbecco's, Sigma Chemical Co., St Louis, MO

- ✓ Teste MTT, USB Corp., Cleveland, OH, EUA
- ✓ Microplacas de 96 poços, Costar, Corning Incorporated, NY, EUA
- ✓ Mufla metálica, OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil
- ✓ Óleo de silicone, VETEC, Rio de Janeiro, RJ
- ✓ Paquímetro digital, Model CD-6'' CSX-B; Mitutoyo Sul Americana Ltda., Suzano, SP, Brasil
- ✓ Piridina, VETEC, Rio de Janeiro, Brasil
- ✓ Politriz, DPU-10, Panambra Ind. e Técn. S.A., São Paulo, SP
- ✓ Prensa hidráulica, PM-2000; Techno Máquinas Ltda, Vinhedo, SP, Brasil
- ✓ Ressonância magnética nuclear de hidrogênio, Bruker 400MHz, Bruker BioSpin Corp., Billerica, MA, EUA
- ✓ Seringa descartável estéril, BD Plastipak, Curitiba, PR
- ✓ Silicona de condensação densa, Zetalabor, Zermack, S.P.A., Badia Polesine, Rovigo, Itália
- ✓ Soro fetal bovino, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, BR
- ✓ Resina acrílica rosa, Lucitone 550; Dentsply International Inc., York, PA, EUA
- ✓ Termopolimerizadora, Termocycler T100, Ribeirão Preto, SP, Brasil

MÉTODO

A maior parte deste trabalho foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As etapas executadas em outros locais serão mencionadas, quando aplicável.

4.1 Síntese do MUPB

O MUPB foi sintetizado com base no procedimento descrito para a obtenção de um monômero semelhante, o MDPB (IMAZATO et al., 1995). A principal diferença foi o uso do reagente 11-bromo-1-undecanol em substituição ao 12-bromo-1-dodecanol. Além disso, efetuou-se um pequeno ajuste na primeira etapa da síntese, a fim de usar temperatura menor do que no método original (90°C a 16 horas). A síntese do MUPB se deu pelas seguintes reações:

Reação 1:

Ácido metacrílico + 11-bromo-1-undecanol a 78°C por 32 horas (Fig. 2).

Reação 2:

Subproduto da reação 1 + Piridina a 100°C por 30 minutos (Fig. 3).

Figura 2 - Material utilizado na síntese do MUPB:
A. Ácido Metacrílico; B. 11-Bromo-1-undecanol

Figura 3 - Material utilizado na síntese do MUPB: Piridina

Um reator foi desenvolvido a fim de se realizarem as duas etapas da síntese do MUPB, com auxílio da Oficina de Precisão do Campus de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Montou-se um recipiente metálico com uma resistência e um sensor térmico, ambos ligados a um controlador eletrônico de temperatura. O recipiente foi preenchido com óleo de silicone e um balão volumétrico de 50 ml foi alojado, conectado a um condensador (Fig. 4).

Figura 4 - Reator desenvolvido para síntese do MUPB: A. Sensor térmico com controlador eletrônico de temperatura; B. Condensador; C. Resistência

Após obtenção do produto final, realizou-se uma validação da rota sintética por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN), no Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O equipamento foi calibrado com uma curva similar àquela esperada para o MUPB (padrão), submeteu-se a amostra ao campo magnético e a curva resultante foi comparada com a curva padrão. Assim que o composto obtido foi identificado como sendo MUPB, prosseguiu-se às demais etapas do estudo.

4.2 Propriedades do MUPB não polimerizado

4.2.1 Concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) do MUPB foi determinada frente aos micro-organismos *C. albicans* (ATCC 90028), *C. dubliniensis* (ATCC 7987S), *C. glabrata* (ATCC 2001), *L. casei* (IAL 2356), *S. aureus* (ATCC 6538) e *S. mutans* (ATCC 25175), capazes de, envolvidos na estomatite protética, colonizar a cavidade bucal e aderir à resina acrílica (CARLSSON et al., 1969; HE et al., 2006; MARSH et al., 1992).

O MUPB foi incorporado à água destilada estéril em quantidade suficiente até atingir uma concentração de 10 mg/ml. Essa solução foi usada para dissolver o meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB) para as leveduras (Fig. 5). Uma alíquota de 50 µl dessa solução foi transferida para o poço de uma microplaca (Fig. 6), e diluições seriadas realizadas a seguir, dividindo a concentração original do MUPB pela metade, nos 11 poços subsequentes. Após, 50 µl de meio de cultura TSB contendo uma faixa de concentração de 1 a 5×10^6 células/ml de cada microrganismo, foram acrescentados aos poços da microplaca e incubados por 24 horas a 37°C em estufa. Foi considerada como CIM aquela, a partir da qual, crescimento de micro-organismos pôde ser evidenciado visualmente.

Figura 5 - Meio de cultura TSB

Figura 6 - Microplaca

No intuito de se fazer uma comparação entre o MUPB e outro composto de amônio quaternário amplamente utilizado, o mesmo procedimento descrito foi repetido com diluições de cloreto de cetilpiridínio (CCP) (Fig. 7). Para os dois compostos avaliados, os testes foram realizados em triplicata.

Figura 7 - Cloreto de cetilpiridínio

4.2.2 Concentração fungicida/bactericida mínima

A partir dos poços sem crescimento visível no ensaio de CIM para ambos os compostos testados, subculturas foram realizadas a fim de determinar a concentração fungicida/bactericida mínima (CFM/CBM). Uma alíquota de 10 µl da suspensão desses poços foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura apropriado para cada tipo de micro-organismo - ágar *Sabourraud* dextrose para as espécies de *Candida* e *Brain Heart Infusion* (BHI) para as bactérias, e o conjunto incubado a 37°C por 24 horas em estufa. Assim, o meio no qual não houve formação de colônias sobre as placas foi considerado representativo da CFM/CBM (Fig. 8).

Figura 8 - Meios de cultura sólidos: A. Ágar *Sabourraud* dextrose; B. Ágar BHI

4.2.3 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Fibroblastos de rato (L929) (Fig. 9) foram cultivados em meio de cultura *Eagle* suplementado com 80 µg/ml de gentamicina e soro fetal bovino a 7,5% (v/v), sob temperatura de 37°C e atmosfera composta por 5% de dióxido de carbono e 95% de ar. A partir desse cultivo, obteve-se uma suspensão contendo 3×10^4 células/ml, da qual alíquotas de 200 µl foram inoculadas em microplacas contendo 96 poços.

Figura 9 - Fibroblastos de rato (L929)

As microplacas foram conservadas nas condições de temperatura e atmosfera descritas anteriormente durante 48 horas. Após esse período, um depósito formado por fibroblastos pôde ser observado no fundo dos poços. Após remoção do meio suprajacente, as células foram removidos, lavadas duas vezes com solução salina fosfatada (PBS) 0.1 mol/l (pH=7.1), e adicionados 200 µl de uma solução contendo MUPB. As soluções empregadas foram obtidas pela dissolução do monômero em meio de cultura completo sem soro fetal bovino, resultando, nas concentrações de 0,0 (controle) 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/ml.

O mesmo procedimento e ensaios posteriores foram repetidos com o MMA, para fins comparativos (Fig. 10). Como o MMA é pouco solúvel em água, este foi dissolvido em dimetil sulfóxido e depois acrescido ao meio de cultura *Eagle* modificado por Dulbecco's em, no máximo, 1%, procedimento comum para o estudo de citotoxicidade de substâncias pouco hidrossolúveis (Fig. 11).

Figura 10 - Metil metacrilato

Figura 11 - Dimetil sulfóxido

4.2.4 Atividade mitocondrial

A viabilidade celular foi avaliada pela atividade mitocondrial através do teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). O mesmo procedimento de incubação em diferentes concentrações de MUPB ou MMA foi realizado. Após 48 horas de exposição das células às soluções-teste, 20 μ l de solução MTT (5mg/ml em PBS 0.1 mol/l, pH=7.1) foram acrescentados a cada poço e incubados a 37°C por 3 horas (Fig. 12). Após esse período, 100 μ l de uma solução de isopropanol acidificado com HCl 0,04 M foi adicionado, sob agitação, a fim de dissolver cristais de formazana. A seguir, a viabilidade celular foi averiguada por meio da diferença entre a absorbância nos comprimentos de 540 nm e 620 nm, usando-se um espectrofotômetro (Fig. 13).

Figura 12 - Sal de MTT

Figura 13 - Espectrofotômetro

Cada situação experimental, para ambos os testes, foi conduzida quatro vezes, conforme estudos anteriores (CAMPANHA et al., 2006; IMAZATO et al., 1999).

4.3 Atividade antisséptica do MUPB incorporado a uma resina acrílica

Foram avaliadas as propriedades antissépticas do MUPB incorporado a uma resina acrílica para base de próteses removíveis, frente às mesmas espécies testadas no item 4.2.1. Utilizando-se espécimes confeccionados em resina acrílica termopolimerizável, foram conduzidos dois testes. O primeiro avaliou o efeito inibitório sobre o crescimento dos micro-organismos, investigando-se o padrão de crescimento sob os espécimes e formação de halo de inibição. O segundo teste investigou como diferentes concentrações do antimicrobiano interfeririam na adesão dos micro-organismos ao polímero.

4.3.1 Obtenção dos espécimes

Foram obtidos espécimes de formatos diferentes para cada tipo de teste realizado. Para isso, foram utilizadas 2 tipos de matrizes metálicas: discoides, com dimensões de 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, e quadrangular, com dimensões de 0,3 mm de espessura, 10 mm de aresta (Fig. 14).

Figura 14 - Matrizes metálicas utilizadas para a confecção dos espécimes de acordo com cada teste: A. Adesão dos microrganismos à resina acrílica; B. Efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos

A confecção dos espécimes baseou-se na inclusão das matrizes metálicas de mesmos formatos em mufla metálica. Para facilitar a remoção das matrizes após a inclusão, as mesmas foram incluídas em silicona de condensação densa, com o auxílio de um dispositivo confeccionado em poliacetal. As matrizes foram fixadas com cera pegajosa no interior do dispositivo de poliacetal e, após correto proporcionamento dos seus componentes, a silicona de condensação foi acomodada no dispositivo. O conjunto foi mantido sob pressão em prensa hidráulica durante a reação de presa do material e, após, os moldes em silicona foram removidos (Fig. 15).

Figura 15 - Material e técnica utilizados para obtenção dos moldes em silicone de condensação. A. Silicona de condensação; B. Dispositivo de poliacetal; C. Matrizes fixadas no dispositivo de poliacetal; D. Material de moldagem acomodado; E. Conjunto mantido sob pressão; F. Abertura do dispositivo; G. Recorte dos moldes em silicone

Os moldes em silicone com as respectivas matrizes foram incluídos em mufla metálica, por meio de gesso pedra, espatulado mecanicamente, na proporção de 30 ml de água para cada 100 g de pó, de acordo com as recomendações do fabricante. Após a presa do gesso, a muflas foram abertas e os padrões metálicos removidos para que a resina acrílica fosse acomodada no interior dos moldes em silicone (Fig. 16).

Figura 16 - Material utilizado para a preparação das muflas. A. Mufla metálica; B. Gesso pedra; C. Muflas preparadas para obtenção dos espécimes

Os espécimes foram confeccionados em resina acrílica rosa (Fig. 17), contendo 3 diferentes concentrações de MUPB em massa: 0, 0,3 ou 0,6%. A resina Lucitone 550 apresenta-se na forma de dois componentes, um pó formado por esferas de PMMA e um líquido composto por MMA e um agente de ligação cruzada, o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA). A proporção preconizada pelo fabricante para a manipulação do material é de 21g do pó para 10 ml do monômero.

Figura 17 - Resina acrílica Lucitone 550

Como a densidade do MMA, maior constituinte da parte líquida, a temperatura ambiente é 0,94 g/ml (STOLF, 2005), cada 10 ml do líquido apresenta aproximadamente 9,4g. Uma dose da resina acrílica possui massa de 30,4g, portanto 182,4 mg de MUPB devem estar presentes no material para uma proporção de 0,6%. A concentração 0,3% foi obtida seguindo o mesmo raciocínio.

A incorporação do MUPB foi realizada pela adição da massa necessária para cada porção da resina acrílica, como um terceiro componente, respeitando-se o critério de peso descrito acima. A alíquota necessária do MUPB foi diluída inicialmente no líquido à base de MMA. A seguir, a massa necessária do polímero foi acrescida lentamente e incorporada à solução. Após atingir a fase plástica, a resina acrílica foi acomodada no interior dos moldes de silicona nas muflas preparadas (Fig. 18).

Figura 18 - A. Espatulação da resina acrílica; B. Inclusão em mufla metálica

Após acondicionamento da resina acrílica, a mufla foi fechada e levada à prensa hidráulica. A prensagem foi realizada de forma lenta e gradual até atingir-se 1,25 tonelada de carga, aguardando-se, a partir daí, um período de 30 minutos sob pressão. Em seguida, os espécimes foram polimerizados em banho de água quente, por meio de uma termopolimerizadora. O ciclo de polimerização empregado compreendeu uma etapa inicial a 73°C durante 90 minutos, seguida por um estágio de 30 minutos a 100°C, segundo as recomendações do fabricante. Concluída a polimerização e resfriamento total da mufla por um período mínimo de 5 horas sobre bancada, os espécimes foram removidos do interior das muflas e o acabamento das faces laterais foi realizado com o auxílio de fresa, e de ambas as faces planas com lixas d'água de diferentes granulações (400, 600 e 1200) em politriz. A medida que o acabamento e polimento eram realizados, os espécimes tinham suas medidas confirmadas por meio de um paquímetro digital (Fig. 19).

Figura 19 - Sequência de obtenção dos espécimes. A. Prensagem; B. Termopolimerização; C. Desinclusão; D. Acabamento; E. Polimento; F. Lixas d'água; G. Paquímetro digital

Na sequência, os espécimes foram limpos e armazenados em 100 ml de água destilada a 37°C por 1 semana, a fim de liberar excessos de monômero residual (HE et al., 2006). Esse meio de imersão foi substituído diariamente (Fig. 20).

Figura 20 - Espécimes imersos em água destilada para liberação do monômero residual

No total, foram obtidos 54 espécimes discoides (10 x 1,0mm) para realização do teste de efeito inibitório sobre o crescimento de micro-organismos (9 para cada micro-organismo) e 180 quadrangulares (10 x 10 x 3mm) para avaliação da adesão dos micro-organismos à resina acrílica após incorporação do MUPB (30 para cada micro-organismo) (Fig. 21).

Figura 21 - Espécimes obtidos

4.3.2 Esterilização dos espécimes

Antes dos experimentos, os espécimes foram inseridos em embalagens apropriadas para esterilização e submetidos a um ciclo de esterilização em óxido de etileno no setor de esterilização do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Fig. 22). É importante ressaltar que esse processo mantém as propriedades da resina acrílica inalteradas (LIN et al., 1999). Os espécimes foram manipulados com um intervalo de, pelo menos, 15 dias após o processo de esterilização, no intuito de eliminar resquícios do gás esterilizante e evitar interferências nos resultados.

Dois espécimes adicionais foram confeccionados para cada concentração do MUPB, esterilizados e imersos em tubos de ensaio contendo meio de cultura TSB, a 37°C por 48 horas. Esse procedimento teve como objetivo confirmar a efetividade da esterilização, que foi averiguada pela ausência de crescimento microbiano após esse período.

Figura 22 - Espécimes esterilizados em oxido de etileno

4.3.3 Efeito inibitório sobre o crescimento de micro-organismos

Micro-organismos das espécies estudadas foram cultivados em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura líquido do tipo TSB em estufa a 37°C. Após 24 horas, os tubos foram agitados e a concentração de micro-organismos ajustada para obter equivalência a uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1 a 5 x 10⁶ células por ml (Fig. 23). Essa concentração celular corresponde a ½ da turvação do tubo nº 1 da escala de MacFarland, ou seja, possui grau de turvação similar a uma solução composta por 0,05 ml de cloreto de bário di-hidratado a 1,175% em 9,95 ml de ácido sulfúrico a 1%.

Figura 23 - Ajuste da quantidade de micro-organismos pela escala McFarland 0,5

Em seguida, 100 µl da suspensão de cada micro-organismo foram transferidos para placas de Petri contendo meio ágar *Sabourraud*-dextrose para as espécies do gênero *Candida*, e meio BHI para as espécies bacterianas. Imediatamente após a inoculação, os espécimes discoides estéreis foram posicionados sobre a superfície do meio de cultura, distantes o suficiente da margem da placa de Petri, bem como um do outro, para não impedir, caso ocorresse, a livre formação do halo de inibição em torno dos espécimes. A seguir, as placas de Petri foram armazenadas em estufa para incubação durante 24 horas a 37°C (Fig. 24).

Após o período de incubação, as placas de Petri foram examinadas, a fim de determinar se houve a formação de halo de inibição em torno dos espécimes. Essa ocorrência determinaria a liberação do antimicrobiano, e em caso positivo, o raio desses halos seria quantificado. A seguir, os espécimes foram removidos das placas e a área em contato com a resina acrílica, observada. O crescimento fúngico sob os espécimes foi avaliado de acordo com um escore (IMAZATO et al., 1998), conforme a tabela 1. Esse exame foi realizado por um examinador cego em relação aos grupos testados.

Figura 24 - Espécimes posicionados em placas de Petri com meio de cultura sólido inoculadas com cada micro-organismo

Tabela 1 - Critérios utilizados para a determinação do crescimento de micro-organismos sob os espécimes

<i>Escore</i>	<i>Status</i>
3	Crescimento ou fixação densos sobre toda a superfície
2,5	Crescimento ou fixação densos sobre mais de 2/3 da superfície
2	Crescimento ou fixação densos sobre 2/3 a 1/2 da superfície, ou crescimento ou fixação moderados sobre toda a superfície
1,5	Crescimento ou fixação densos sobre 1/2 a 1/3 da superfície
1	Crescimento ou fixação densos sobre 1/3 a 1/5 da superfície, ou crescimento ou fixação leves sobre toda a superfície
0,5	Crescimento ou fixação sobre menos de 1/5 da superfície
0	Ausência de crescimento ou fixação

Para todos os micro-organismos, três espécimes de cada grupo foram testados.

4.3.4 Adesão dos micro-organismos à resina acrílica

Suspensões de cada micro-organismo foram preparadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura (TSB), previamente autoclavados. Esses tubos foram inoculados e armazenados a 37°C em condições de aerobiose, durante 24 horas. Após esse período, esses tubos tiveram a quantidade de micro-organismos ajustada para escala de McFarland 0,5 e receberam os espécimes esterilizados. A seguir, o conjunto foi armazenado por mais 24 horas a 37°C (Fig. 25).

Figura 25 - Espécimes imersos em suspensões de cada micro-organismo

Após esse período, os espécimes foram removidos e lavados com solução salina estéril, de forma breve e por cinco períodos, com o auxílio de uma seringa descartável estéril, a fim de remover micro-organismos fracamente aderidos (LEFEBVRE et al., 2001). A seguir, foram imersos em 10 ml de solução salina estéril, no interior de tubos de ensaio previamente autoclavados. Os tubos foram agitados vigorosamente em vortex durante 1 minuto e deixados em repouso por mais 9 minutos. A seguir, os tubos foram novamente agitados, a fim de desprender micro-organismos ainda aderentes, e diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram obtidas a partir dessa solução salina.

Placas de Petri com um meio de cultura adequado para cada micro-organismo foram previamente preparadas. A área da placa foi dividida em três partes: 50% da área para receber a diluição 10^{-1} e 25% para cada uma das outras diluições, 10^{-2} e 10^{-3} . Sobre essas placas, 10 μ l da solução salina inoculada foram espalhadas por meio de alças calibradas. Foram armazenadas a 37°C por 48 horas, e após o crescimento das colônias, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi calculado (Fig. 26).

Figura 26 - Colônias formadas

4.4. Análise dos resultados

Os dados obtidos pelo item 4.1 foram avaliados qualitativamente, conforme usualmente empregado em análise química. A maior parte dos testes, porém, derivou variáveis quantitativas com indicação de estatística inferencial para comparação entre dois ou mais grupos. Nesse caso, a aderência a distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram investigadas, a fim de empregar o teste mais apropriado.

Para os testes do item 4.2, as hipóteses nulas envolviam a igualdade entre o MUPB e os compostos controle (CCP ou MMA) frente a cada espécie. Os dados do item 4.2.1 e 4.2.2, associados às CIM e CFM/CBM, foram apresentados pelos valores médios e desvios padrão, devido a uma simetria nos dados. Porém, usou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre o MUPB e o CCP. Os resultados de citotoxicidade (4.2.3) para os diferentes compostos e concentrações foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) a dois fatores independentes, seguida do teste Student-Newman-Keuls.

No caso dos testes feitos com os espécimes em resina acrílica, as hipóteses nulas compreendiam que nenhuma das três concentrações de MUPB incorporado na resina acrílica (controle, 0,3 e 0,6%) alteraria as variáveis em questão. O efeito inibitório (4.3.3) das três concentrações gerou uma variável ordinal e foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis. A adesão microbiana observada para os três grupos foi comparada por meio de ANOVA a um fator seguida do teste HSD de Tukey. Como não foi objetivo deste estudo, nenhuma comparação foi realizada no intuito de verificar se diferentes espécies produzem resultados diferentes, bem como interações entre esse fator e os demais.

Todos os testes estatísticos foram empregados obedecendo-se a um nível de significância (α) de 0,05. O programa PASW Statistics 17 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA) foi empregado para as análises descritivas e inferenciais.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Síntese do MUPB

Ao fim da reação, obteve-se uma substância líquida à temperatura ambiente, translúcida e de cor âmbar (Fig. 27). A análise por ^1H -RMN identificou os principais elementos químicos do composto sintetizado e sua organização molecular, comparando-se com a curva padrão para o MUPB. A figura 28 descreve a estrutura química do MUPB, bem como o espectro obtido para essa fórmula por meio da ^1H -RMN, caracterizando a curva padrão para o composto. Na figura 29, podemos observar o espectro obtido após submissão do composto sintetizado à ressonância, caracterizando a curva experimental. Os resultados obtidos mostram coincidência entre as duas curvas.

Figura 27 - Aspecto visual do composto sintetizado

Figura 28 – Fórmula estrutural do MUPB e sua curva padrão

Figura 29 – Curva experimental obtida para o composto sintetizado, compatível com a padrão

5.2. Propriedades do MUPB não polimerizado

5.2.1. Concentração inibitória mínima

A tabela 2 apresenta os valores de média (desvio-padrão) para CIM do MUPB não polimerizado e do CCP para todas as espécies estudadas. O MUPB tendeu a apresentar menores valores de CIM que o CCP para todos os micro-organismos. A comparação desses valores está apresentada no gráfico 1, onde se pode observar que as diferenças entre os dois compostos foi significativa somente para *C. dubliniensis* e *S. mutans*.

Tabela 2 – Resultados médios (desvios-padrão) para a CIM (mg/ml) do CCP e do MUPB para as espécies estudadas

	CCP	MUPB
<i>C. albicans</i>	0,84 (0,71)	0,63 (0,00)
<i>C. dubliniensis</i>	5,83 (3,82)	0,83 (0,36)
<i>C. glabrata</i>	5,42 (4,39)	1,04 (0,36)
<i>S. mutans</i>	3,33 (1,44)	1,04 (0,36)
<i>S. aureus</i>	3,57 (5,58)	1,75 (0,66)
<i>L. casei</i>	6,67 (5,77)	0,63 (0,00)

5.2.2. Concentração fungicida/bactericida mínima

No caso da CFM/CBM, uma diferença menor entre os dois compostos foi observada para a maioria das espécies (Tab. 3). Diferenças entre os dois compostos são nítidas apenas para *C. albicans*, com o MUPB apresentando CFM maior que o CCP. Conforme os valores no gráfico 2, o teste de Mann-Whitney confirma a significância dessa diferença. Por outro lado, a CFM/CBM para o MUPB não polimerizado e do CCP das demais espécies não apresentaram diferença significativa.

Tabela 3 – Resultados médios (desvios-padrão) para a CFM/CBM (mg/ml) do CCP e do MUPB para as espécies estudadas

	CCP	MUPB
<i>C. albicans</i>	0,84 (0,71)	5,83 (3,82)
<i>C. dubliniensis</i>	5,83 (3,82)	6,67 (2,89)
<i>C. glabrata</i>	5,42 (4,39)	5,21 (4,69)
<i>S. mutans</i>	5,83 (3,82)	4,17 (1,44)
<i>S. aureus</i>	3,59 (5,55)	5,83 (3,82)
<i>L. casei</i>	6,68 (5,75)	4,58 (4,73)

Gráfico 2 - Valores médios para as CFM/CBM. As barras de erro representam os desvios-padrão, e os valores de P referem-se ao teste de Mann-Whitney comparando as duas substâncias testadas (*Diferença significativa ($P < 0,05$); ^(ns)Diferença não significativa ($P > 0,05$))

5.2.3. Citotoxicidade

A tabela 4 e o gráfico 3 apresentam os resultados médios (desvios-padrão) para a absorbância (%) a 570 nm, após o teste MTT nas células cultivadas por 48 horas. Os resultados foram comparados em termos dos monômeros e concentrações testados, por meio de ANOVA para dois fatores. Comparações entre pares foram realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. O nível de significância foi de 0,05 (Tab. 5).

Tabela 4 - Resultados médios (desvios-padrão) para a absorbância (%) a 570 nm

	Concentração (g/l)				
	0,01	0,05	0,25	0,5	1
MMA	95,3 (4,5) ^{Aa}	93,8 (5,1) ^{Aa}	96,9 (1,8) ^{Aa}	89,2 (6,2) ^{Aa}	65,7 (9,1) ^{Ab}
MUPB	90,0 (6,0) ^{Aa}	52,3 (6,3) ^{Bb}	6,5 (0,8) ^{Bc}	7,2 (0,7) ^{Bc}	8,3 (0,5) ^{Bc}

Letras maiúsculas: comparação entre os monômeros; Letras minúsculas: comparação entre concentrações; Letras iguais: representam igualdade estatística (Teste de Student-Newman-Keuls)

Gráfico 3 - Representação da absorbância percentual média após teste MTT e respectivos desvios-padrão.

Tabela 5 - ANOVA a dois fatores para os resultados do teste MTT

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
Monômero	3,061377	1	3,061377	1227,448	<0,001*
Concentração	1,578628	4	0,394657	158,2364	<0,001*
Interação	0,929576	4	0,232394	93,17758	<0,001*
Resíduo	0,074823	30	0,002494		
Total	5,644404	39			

*Diferença significativa ($P < 0,05$)

As diferenças entre os dois monômeros e concentrações testadas, bem como sua interação, foram altamente significantes. Apenas na menor concentração (0,01g/l), os dois monômeros foram semelhantes, sem redução no número de células viáveis. Para o MMA, diferença significativa na redução da viabilidade celular só foi encontrada para a maior concentração (1g/l). Para o MUPB, o aumento da concentração de 0,01g/l para 0,05g/l levou a uma queda da média de absorbância em, aproximadamente, 42%. A média de absorbância foi reduzida em, aproximadamente, 87% quando a concentração de MUPB passou a ser de 0,25 g/l, mantendo-se sem diferença significativa de valores para as demais concentrações. A figura 30 ilustra o aspecto do meio de acordo com a viabilidade celular dos fibroblastos para cada concentração de ambos os monômeros.

Figura 30 - Microplaca utilizada para o ensaio de citotoxicidade, e respectivo gabarito (direita). Quanto mais intenso o tom violeta nos poços, maior o número de células L929 viáveis (teste MTT)

5.3. Atividade antisséptica do MUPB polimerizado a uma resina acrílica

5.3.1 Efeito inibitório sobre o crescimento de micro-organismos

Em nenhuma repetição observou-se a ocorrência de halo de inibição, independente do grupo e da espécie testada. Isso indica que não houve presença significativa de eluatos capazes de inibir o crescimento normal dos micro-organismos.

Os resultados do crescimento microbiano sob os espécimes estão apresentados na tabela 6. Para todos os micro-organismos, não houve diferença significativa entre o padrão de crescimento sob os espécimes, independente da concentração do MUPB presente, indicando uma ausência de inibição desse crescimento por contato.

Tabela 6 – Resultados para o efeito inibitório. Escores observados para o crescimento microbiano sob os espécimes e teste de Kruskal-Wallis

Espécie	Espécime	Grupos			Teste de Kruskal-Wallis
		Controle (0%)	0,30%	0,60%	
<i>C. albicans</i>	1	2	1	1	KW = 1,654; P = 0,437 ^(ns)
	2	1	2,5	1,5	
	3	1,5	2,5	1	
<i>C. dubliniensis</i>	1	0	0	0,5	KW = 1,143; P = 0,565 ^(ns)
	2	0,5	0,5	0,5	
	3	0,5	0,5	0,5	
<i>C. glabrata</i>	1	1	1	1,5	KW = 0,164; P = 0,921 ^(ns)
	2	0	0,5	0,5	
	3	2,5	1,5	0,5	
<i>S. mutans</i>	1	0	0,5	0	KW = 0,800; P = 0,670 ^(ns)
	2	0	0	0	
	3	0,5	0,5	0,5	
<i>S. aureus</i>	1	0	0,5	0	KW = 0,800; P = 0,670 ^(ns)
	2	0	0	0,5	
	3	0,5	0,5	0	
<i>L. casei</i>	1	0	0	0	KW = 0,000; P = 1,000 ^(ns)
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	

^(ns) Diferença não significativa (P > 0,05)

5.3.2. Adesão dos micro-organismos à resina acrílica

A avaliação da atividade antimicrobiana da resina acrílica contendo o MUPB foi realizada após a contagem do número de UFC/ml para cada micro-organismo. Quanto menor esse número, maior a atividade antimicrobiana. Previamente à análise dos resultados, os dados obtidos para as contagens foram transformados de acordo com a fórmula $\log(\text{UFC}+1)/\text{ml}$. As médias (desvios-padrão) de UFC/ml depois do contato com os espécimes estão listados na tabela 7. ANOVA indicou diferença significativa entre os grupos somente para a *C. albicans* (Tab. 8). A espécie *L. casei* foi analisada por métodos não paramétricos, devido à distribuição dos resultados, e encontra-se na tabela 9 apenas para fim ilustrativo.

Tabela 7 - Resultados médios (desvios-padrão) do número de UFC/ml para cada micro-organismo após transformação logarítmica ($\log_{10}$)

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. casei</i>
0%	5,6 (0,7)	6,1(0,6)	5,0 (0,4)	5,9 (0,6)	6,7(0,5)	0,9 (2,4)
0,3%	5,9 (0,4)	5,7 (0,7)	4,9 (0,3)	5,7 (0,5)	7,1 (1,1)	0,7 (2,1)
0,6%	4,9 (0,7)	6,1(0,5)	5,0 (0,5)	5,7 (0,3)	6,8 (0,4)	1,3 (2,4)

Tabela 8 - ANOVA para as contagens de aderência microbiana

Espécie	Fonte de variação	SQ	Gl	QM	F	P
<i>C. albicans</i>	Entre grupos	5,76	2	2,88	7,16	0,003*
	Resíduo	10,86	27	0,40		
	Total	16,63	29			
<i>C. dubliniensis</i>	Entre grupos	0,70	2	0,35	1,04	0,372 ^(ns)
	Resíduo	7,09	21	0,34		
	Total	7,79	23			
<i>C. glabrata</i>	Entre grupos	0,05	2	0,03	0,13	0,880 ^(ns)
	Resíduo	4,16	21	0,20		
	Total	4,21	23			
<i>S. mutans</i>	Entre grupos	0,29	2	0,15	0,57	0,577 ^(ns)
	Resíduo	5,40	21	0,26		
	Total	5,69	23			
<i>S. aureus</i>	Entre grupos	0,56	2	0,28	0,50	0,612 ^(ns)
	Resíduo	11,64	21	0,55		
	Total	12,20	23			

*Diferença significativa ($P < 0,05$); ^(ns)Diferença não significativa ($P > 0,05$).

Os gráficos 4 à 8 apresentam os valores de $\log(\text{UFC} + 1)/\text{ml}$ para *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*, respectivamente. A *C. albicans* foi a espécie mais sensível ao monômero antimicrobiano. A presença do MUPB na concentração de 0,6% reduziu de forma significativa a adesão do micro-organismo à resina acrílica, demonstrando melhor atividade antimicrobiana ($P=0,003$). Para os demais micro-organismos, a presença do monômero experimental não modificou a contagem de $\log(\text{UFC}+1)/\text{ml}$ para cada espécie em relação aos valores encontrados do controle.

No caso do *L. casei*, a maior parte dos espécimes não apresentou quantidades aderidas detectáveis. Para o grupo controle, apenas um espécime apresentou contagens maior que zero (6,8 $\log(\text{UFC}+1)/\text{ml}$). Para o grupo 0,3%, o mesmo ocorreu, sendo que o único valor positivo foi 5,9 $\log(\text{UFC}+1)/\text{ml}$, e para 0,6%, os dois valores positivos foram 4,5 e 5,8 $\log(\text{UFC}+1)/\text{ml}$. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis, devido à assimetria nos resultados. Nesse caso, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (KW = 0,323; $P = 0,851$).

Gráfico 4 - Contagens médias de *C. albicans* aderida aos espécimes. As barras de erro representam os desvios-padrão. Médias localizadas sob a barra horizontal são semelhantes (teste HSD de Tukey, $\alpha = 0,05$)

Gráfico 5 - Contagens médias de *C. dubliniensis* aderida aos espécimes.
As barras de erro representam os desvios-padrão

Gráfico 6 - Contagens médias de *C. glabrata* aderida aos espécimes.
As barras de erro representam os desvios-padrão

Gráfico 7 - Contagens médias de *S. mutans* aderido aos espécimes.
As barras de erro representam os desvios-padrão

Gráfico 8 - Contagens médias de *S. aureus* aderido aos espécimes.
As barras de erro representam os desvios-padrão

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

O estudo inicial das propriedades biológicas do MUPB foi realizado na sua forma não polimerizada; por este estudo se observou atividade antimicrobiana contra todas as espécies testadas. Esse achado é semelhante ao encontrado para o MDPB, monômero estruturalmente semelhante e com forte atividade antimicrobiana contra diversas espécies do gênero *Streptococcus* e *Lactobacillus*, dentre outras bactérias (EBI et al., 2001; IMAZATO et al., 1994, 1995, 1997, 2001, 2002, 2003, 2006, 2008; KORKMAZ et al. 2008; YOSHIKAWA et al., 2007). Embora diferença significativa entre os valores de CIM do CCP e do MUPB tenha sido encontrada apenas para *C. dubliniensis* e *S. mutans*, os valores de CIM do MUPB para todos os micro-organismos foram menores, demonstrando a atividade antimicrobiana do monômero experimental. O MDPB, monômero que vem sendo incorporado a compósitos restauradores, *primers* e adesivos dentinários com eficácia antimicrobiana comprovada, apresentou valores de CIM frente a *S. mutans* e *L.casei* mais elevados que os do CCP (IMAZATO et al., 1994, 2006), discordando dos resultados do presente estudo, diferença esta, não esperada. Considerando ser o CCP um antimicrobiano de amônio quaternário de amplo espectro frequentemente utilizado em dentifrícios e enxaguatórios bucais (GIULIANA et al., 1997), os resultados demonstram o potencial do MUPB como antimicrobiano, bem como em comparação ao MDPB.

Os valores de CIM para o MUPB também se assemelham aos encontrados por Xiao et al. (2008) quando avaliaram as propriedades biológicas dos monômeros a base de sal de amônio quaternário - cloreto de metacriloxietilbenzildimetil amônio (DMAE-BC) e cloreto de metacriloxietil-m-cloro-benzildimetil amônio (DMAE-m-CBC). Frente ao *S. mutans*, os valores de CIM para o MUPB foram semelhantes ao do DMAE-BC e do DMAE-m-CBC (1,04, 1,56 e 1,56 mg/ml, respectivamente). Frente ao *S. aureus*, esses valores foram de 1,75, 1,56 e 1,56 mg/ml, respectivamente. Frente ao *L. casei*, entretanto, o MUPB apresentou menor valor de CIM (0,63 mg/mL) quando comparado ao DMAE-BC e o DMAE-m-CBC (1,56 e 3,12 mg/ml, respectivamente).

Quando em comparação ao MUPB, o monômero MDPB apresentou valores de CIM bem inferiores, bem como exerceu efeito mais pronunciado na inibição do crescimento microbiano. Um dos possíveis fatores envolvidos nesta diferença é a maior extensão da cadeia

carbônica do MDPB, composta por 12 átomos de carbono, enquanto que o MUPB apresenta 11 átomos. A atividade antimicrobiana dos sais de piridínio poliméricos é aumentada com a presença de cadeias carbônicas em sua estrutura e, quanto maior for a extensão dessa cadeia ligada ao anel piridínio, maior será a interação hidrofóbica com a dupla camada lipídica da parede celular, melhorando a atividade antimicrobiana do composto (IMAZATO et al., 1995, XIAO et al., 2008). Assim, pode-se vincular essa característica ao fato de o MDPB ter reduzido de forma mais significativa a adesão de *S. mutans* ao material polimérico (IMAZATO et al., 1994), quando em comparação ao MUPB. A relação direta do aumento da cadeia carbônica com o aumento nos valores de CIM também foi encontrada por Xiao et al. (2008). Os monômeros DMAE-BC e DMAE-m-CBC, cuja diferença é a substituição do grupo benzila do primeiro composto pelo grupo m-cloro benzila para obtenção do segundo composto, por possuírem cadeia carbônica de mesma extensão, apresentaram valores de CIM semelhantes. Entretanto, outro composto semelhante avaliado, o cloreto de metacriloiloxicetil dimetil amônio (DMAE-CB), formado pela substituição do radical benzila por um radical contendo 16 átomos de carbono, apresentou valores significativamente menores de CIM para todas as espécies testadas.

De forma semelhante para a CIM, os valores de CFM/CBM variaram de acordo com a espécie. A diferença entre os MUPB e o CCP foi significativa para a *C. albicans* com o CCP apresentando maior atividade bactericida. Assim como para CIM, esses resultados fortalecem o potencial do MUPB como antimicrobiano. Os valores de CBM para o MDPB frente aos micro-organismos estudados por Imazato et al. (1999, 2006) foram superiores quando comparado ao CCP. Os autores atribuíram essa diferença à maior solubilidade do CCP em água, levando a uma maior afinidade com as células, bem como a influência do grupo metacriloil presente na molécula do MDPB na hidrofobicidade, podendo resultar em menor capacidade de interação com a parede celular, quando comparado ao CCP. Para o MUPB, os valores de CFM/CBM se apresentaram 3,33–9,25 vezes maiores quando comparados aos valores de CIM, o que também foi observado para o MDPB (IMAZATO et al. 1999), indicando semelhança entre o mecanismo de ação antimicrobiana do MUPB com o do MDPB. Entretanto, em comparação ao MUPB, os valores de CBM do MDPB foram inferiores, apontando para uma maior atividade bactericida em menores concentrações do produto (IMAZATO et al. 1999, 2001).

Assim como para os demais micro-organismos testados, o valor de CFM do MUPB frente a *C. albicans* foi maior que o de CIM. Esse achado diverge do estudo de Yoshikawa et al. (2007), o primeiro a investigar o efeito do MDPB sobre esse micro-organismo e que encontrou valor semelhante de CIM e CFM. Apesar dessa diferença, a *C. albicans* demonstrou grande suscetibilidade ao efeito inibitório para ambos os monômeros, em comparação às demais espécies. Embora não tenha sido objetivo do presente estudo fazer comparação entre espécies, o *L. casei* foi um dos micro-organismos testados que apresentou menores valores de CIM e CBM. Tais resultados estão de acordo com os achados para o MDPB (YOSHIKAWA et al., 2007). Até o último levantamento realizado (outubro de 2009), não encontramos nenhum trabalho investigando o efeito do MDPB frente as espécies *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *S. aureus*.

Conforme o mecanismo de ação descrito para os compostos de amônio quaternário MDPB (IMAZATO et al., 1997, 1999, 2006) e TBAEMA (THOMASSIN et al., 2007), a ação antimicrobiana do MUPB se dá por meio de reação catiônica do grupamento amônio quaternário aos componentes carregados negativamente da parede celular microbiana, levando a alteração da função da membrana, rompimento da mesma e liberação de componentes citoplasmáticos. A parede celular fúngica é constituída basicamente de β -glucanos e manoproteínas. Estes, presentes na camada externa, conferem características aniônicas aos fungos. Assim, a carga positiva do átomo de nitrogênio presente no anel piridínico tende a interagir facilmente com a parede celular do micro-organismo (EBI et al., 2001). Esse mecanismo difere de outros compostos incorporados à resina acrílica que aumentam a hidrofília do material por incorporação de radicais aniônicos. Nesse último caso, tem-se a adição de ácido metacrílico como exemplo, o qual cria um ambiente de repulsão eletrostática pela interação da carga negativa da superfície do material modificado com a carga negativa da parede celular do micro-organismo (PARK; PERIATHAMBY; LOZA, 2003; PARK et al. 2008).

Compostos que apresentam grande atividade antimicrobiana podem apresentar efeitos citotóxicos. Assim, foi importante avaliar a citotoxicidade do MUPB na sua forma não polimerizada. O MUPB apresentou efeito citotóxico em fibroblastos de rato em concentrações acima de 0,01 g/l. O efeito intenso do MUPB sobre a viabilidade celular, quando comparado ao MMA, pôde ser observado no gráfico 3. Um dado importante que se deve buscar quando da realização de testes de citotoxicidade é a concentração do composto testado que causa 50%

de redução da viabilidade celular (IC50). Para o MUPB, o IC50 pôde ser identificado aproximadamente na concentração de 0,05 mg/ml. Esse resultado está de acordo com o composto MDPB, cujo IC50 frente a células pulpare humanas girou em torno de 0,04 mg/ml (IMAZATO et al., 1999). Dentro da faixa de concentração avaliada, o MMA não atingiu seu IC50, pois na maior concentração (1mg/mL), a redução encontrada foi de 31%. Assim, o MUPB apresentou toxicidade superior a 20 vezes em comparação ao MMA. Essa relação é similar àquela encontrada entre determinados monômeros utilizados em resinas compostas restauradoras, como o HEMA e o UDMA (GEURTSEN et al., 1998). No caso, o UDMA foi aproximadamente 20 vezes mais tóxico que o HEMA, um monômero muito parecido quimicamente com o MMA, e trata-se do principal monômero presente nas resinas fotopolimerizáveis para base de prótese.

Embora o monômero experimental tenha se apresentado mais tóxico que o MMA, uma série de outros monômeros rotineiramente usados nos sistemas adesivos dentinários apresentam valores de IC50 superiores ao MUPB. Ratanasathien et al. (1995) investigaram a citotoxicidade de monômeros presentes em polímeros odontológicos e encontraram IC50 de 0,468 mg/mL para o HEMA, 0,0048 mg/mL para o Bis-GMA, 0,0357 mg/ml para o TEGDMA e 0,0087 mg/ml para o UDMA. Hanks et al. (1991) encontraram IC50 de 0,0067 mg/ml para o Bis-GMA, 0,0059 mg/ml para o UDMA e 0,0189 mg/mL para o TEGDMA. Frente a esses resultados, o MUPB somente apresentou maior toxicidade que o HEMA. Mesmo o MDPB tendo citotoxicidade semelhante aos monômeros citados acima (IMAZATO et al. 1999, 2000), os autores apontam que resultados de testes de citotoxicidade in vitro permanecem limitados até que ensaios com maior relevância clínica sejam realizados. Assim, a toxicidade do MUPB sobre células humanas não pode ser deduzida meramente a partir dos resultados dos testes de citotoxicidade in vitro.

Quando submetidos ao teste de difusão em disco, tanto os grupos controle quanto os experimentais não produziram halos de inibição, independente da sua concentração e da espécie testada. Isso sugere que nenhum componente, incluindo alguma provável fração de MUPB não polimerizado, foi liberado dos espécimes para o meio. Esse teste foi conduzido em estudos com o MDPB frente a *A. viscosus*, *L. casei* e diversas espécies do gênero *Streptococcus*, onde o monômero foi incorporado em resina composta e *primer* dentinário (IMAZATO et al. 1994, 1998a, 1998b; KORKMAZ, OZALP, ATTAR, 2008), e com o TBAEMA frente à espécie *Escherichia coli* (LENOIR et al., 2006). Ausência de halos de

inibição foi evidenciada para todos os grupos, frente a cada micro-organismo. Quando incorporado em resina acrílica, o MDPB também demonstrou efeito sobre o crescimento e acúmulo de *S. mutans*, mas sem a formação de halos de inibição (KURARAY COMPANY, 1995). Os autores atribuem esses achados à ausência significativa de eluatos capazes de inibir o crescimento normal dos micro-organismos.

A não liberação de compostos ao meio é um forte indicativo da imobilização do MUPB na cadeia polimérica. Apesar de não termos investigado o processo de copolimerização entre o radical metacrilato no MUPB e os monômeros da resina acrílica, essa seria a explicação mais provável para os resultados apresentados. Por outro lado, a extremidade oposta da molécula do MUPB, composta por um grupo amônio quaternário, fica livre, exercendo sua ação antimicrobiana por meio do contato direto com o micro-organismo. Pela grande semelhança química entre o MUPB e o MDPB, é possível esperar a mesma reação de copolimerização proposta para o segundo (IMAZATO et al., 1994).

Nesse estudo, classificamos o crescimento microbiano sob os espécimes por meio de escores, conforme apresentado por Imazato et al. (1998a). A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os escores para os grupos experimentais e controle, independente do micro-organismo testado. Apesar de o crescimento de *S. mutans*, *L. casei* e *A. viscosus* sob espécimes contendo MDPB ter sido significativamente reduzido comparado aos respectivos grupos controle (IMAZATO et al., 1992, 1994, 1995, 1998a, 1998b), os autores consideram o método de atribuição de escores utilizado em seu estudo ainda subjetivo. Assim, embora seja aparente que a presença do MUPB na resina acrílica testada não exerça efeito inibitório sobre o crescimento microbiano, existe a necessidade de métodos mais precisos e objetivos para essa avaliação. Por outro lado, seria esperado um efeito no mínimo tão intenso quanto o observado no estudo com o MDPB.

No caso do teste de adesão dos micro-organismos à resina acrílica, a espécie influenciada de forma significativa foi a *C. albicans*. O grupo contendo 0,3% de MUPB não apresentou diferença em relação ao grupo controle, enquanto que na concentração 0,6% o monômero conseguiu reduzir a quantidade de células aderidas aos espécimes, o que demonstra uma relação dose-resposta do composto semelhante a outros produtos antimicrobianos (PESCI-BARDON et al., 2004, 2006; EL-CHARKAWI et al., 1994; CHOW; MATEAR; LAWRENCE, 1999). Pesci-Bardon et al. (2004, 2006) incorporaram um polímero

contendo radicais do tipo amônio quaternário (Poly202063A) a uma resina acrílica para base de prótese e também encontraram redução na adesão para a *C. albicans*. Entretanto, esse efeito só foi encontrado quando o polímero estava presente nas proporções 40% e 50% de relação pó/pó, o que demonstra a capacidade antimicrobiana do MUPB frente a esse fungo mesmo em pequenas proporções. Diferentemente dos achados do presente estudo, Pesci-Bardon et al. (2004, 2006) encontraram redução significativa na adesão de *S. aureus* para todos os grupos contendo o polímero antimicrobiano. Esse achado pode estar relacionado com a diferença de protocolo, onde os espécimes do estudo citado foram imersos em saliva artificial por 4 semanas, podendo ter exercido efeito direto na diminuição da adesão desse micro-organismo (MOURA et al., 2006; PEREIRA-CENCI et al. 2008a, 2008b; RAMAGE et al., 2001), bem como a concentração do material. Assim, a presença das proteínas salivares responsáveis pela formação da película microbiana sobre a superfície protética pode ter influência direta no efeito do MUPB polimerizado, o que aponta a necessidade de futuras investigações da sua atividade antimicrobiana na presença da saliva.

Embora os resultados para o teste de inibição da adesão microbiana tenham mostrado redução significativa para a *C. albicans*, o mesmo não aconteceu com as outras espécies. Considerando a similaridade dos substratos e do biocida utilizados na confecção dos espécimes de cada grupo, a diferença entre o efeito na adesão dos micro-organismos testados pode estar relacionada às características de cada espécie (HE et al. 2006). Kanazawa et al. (1993) mencionaram que a sensibilidade microbiana a um substrato contendo algum biocida imobilizado é dependente de cada tipo de espécie e de suas características específicas. Dentre elas, destaca-se a hidrofobicidade celular que, unida a outros fatores como a produção de enzimas extracelulares e a capacidade de formação de hifas, determinam a virulência do biofilme (SAMARANAYAKE et al., 1995).

No caso das espécies de *Candida* estudadas, o efeito do MUPB incorporado sobre apenas uma é um achado interessante, e que pode ser atribuído a características das paredes celulares fúngicas. Por possuir maior valor de hidrofobicidade celular superficial (HCS) em relação a *C. albicans*, a *C. glabrata* apresenta maior adesão a superfícies acrílicas (LUO et al., 2002). Por outro lado, o valor de HCS da *C. albicans* pode sofrer alterações por fatores ambientais como a temperatura de incubação e pelo efeito de drogas antifúngicas, o que não acontece para a *C. dubliniensis*, a qual apresenta mais estabilidade de HCS (DE SOUZA et al., 2009). Outros trabalhos evidenciaram essa diferença de adesão a superfícies acrílicas. He

et al. (2006), ao avaliarem a adesão de 4 espécies de *Candida* a 6 diferentes resinas acrílicas, encontraram maiores valores de adesão para *C. glabrata* seguida pela *C. dubliniensis*, bem como Luo et al. (2002), os quais encontraram adesão significativamente maior de *C. glabrata* em comparação à *C. albicans*.

As três espécies bacterianas testadas, *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*, são do tipo gram-positivas e apresentaram-se pouco influenciáveis pelo MUPB quando polimerizado à resina acrílica. O MUPB pareceu, por sua vez, não exercer efeito sobre a adesão desses micro-organismos ao substrato. Esses resultados estão de acordo com Kawahara et al. (2000), que encontraram menor suscetibilidade das bactérias gram-positivas testadas, *S. mutans* e *S. aureus*, ao zeólito de prata que as gram-negativas. Os autores mostram que as características das paredes celulares desses micro-organismos podem estar envolvidas no padrão de suscetibilidade, pelo menos em parte. Em relação às bactérias gram-negativas, a parede celular das gram-positivas contém de 3 a 20 vezes mais peptidoglicanos, o que pode permitir que menos cátions nitrogenados atinjam a membrana plasmática do que nas espécies gram-negativas. O mesmo comportamento de bactérias gram-positivas foi apontado por Monteiro et al. (2009) as quais se apresentam menos susceptíveis aos compostos antimicrobianos a base de nanopartículas de prata. De forma semelhante, menor suscetibilidade ao MDPB foi encontrada para as espécies do gênero *Lactobacillus* (IMAZATO et al., 2001).

Imazato et al. (1995) investigando a adesão de *streptococcus* orais a uma resina composta contendo MDPB, encontraram redução na adesão em espécies (*S. oralis*, *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguis*). Entretanto, a incorporação do monômero foi feita na proporção de 20% em massa, enquanto que no presente estudo essa incorporação foi de 0,3 e 0,6% em massa. Foi relatado que a fração molecular antimicrobiana do MDPB, o dodecilpiridínio, é bem menor que o tamanho de células bacterianas (IMAZATO et al. 1995). O mesmo pode ser afirmado para a porção ativa do MUPB, o undecilpiridínio. Devido à baixa concentração de MUPB utilizada, a densidade da porção ativa presente no material pode não ter sido suficiente para apresentar efeito bacteriostático. Também, diferente das resinas compostas cuja porção orgânica ocupa uma pequena proporção da massa, a resina acrílica é um material totalmente orgânico, o que proporcionaria uma melhor distribuição do MUPB ao longo de toda a massa dos espécimes acrílicos, diluindo ainda mais seu efeito. Assim, a ausência de inibição do crescimento microbiano sob os espécimes bem como os achados para a redução da adesão da maioria das espécies estudadas podem ser, provavelmente, atribuídos a esses fatores,

demonstrando a necessidade de uma densidade maior da porção ativa na superfície do material para melhorar o efeito do MUPB quando imobilizado na matriz polimérica.

Em relação ao *S. aureus*, também não foi evidenciada inibição do crescimento bem como diminuição da adesão do micro-organismo à resina acrílica com a presença do MUPB. O TBAEMA, um monômero antimicrobiano de ação por contato, demonstrou efeito significativo na adesão desse micro-organismo. Entretanto, as concentrações utilizadas – 1,5, 3 e 5% em massa – foram superiores as do MUPB (SEYFRIEDSBERGER; RAMETSTEINER;# KERN, 2006), assim como no estudo de Imazato et al. (1995). Outros estudos encontraram efeito significativo na redução da adesão do *S. aureus* por meio de recobrimento superficial no substrato avaliado, o que conferiria maior disponibilidade do composto antimicrobiano em contato com o micro-organismo (HIROTA et al. 2005; IGNATOVA et al., 2006; PARK et al., 2008).

Comparando-se os resultados do presente estudo, não foi evidenciada correlação entre a atividade antimicrobiana do MUPB não polimerizado frente aos micro-organismos testados e seu efeito quando na forma polimerizada. O efeito do MUPB na inibição do crescimento microbiano, bem como na redução da adesão dos micro-organismos não foi tão expressivo quanto na forma não polimerizada. Esses achados foram semelhantes para o MDPB, para o qual as espécies mais sensíveis à forma não polimerizada, ou seja, que apresentaram menores valores de CIM e CBM, não foram as que sofreram menor redução na adesão ao compósito testado contendo o MDPB (IMAZATO et al. 1995). Assim, deve ser investigada qual a máxima concentração do MUPB que pode ser incorporada à resina acrílica para que seu efeito sobre a adesão dos micro-organismos seja significativo, sem, no entanto, promover alterações adversas nas propriedades do material.

As divergências encontradas entre os resultados do presente estudo e dos diversos trabalhos citados podem estar relacionadas a diferenças no protocolo como tratamento prévio dos espécimes com saliva, e à utilização de diferentes substratos, os quais apresentariam diferenças nos valores de energia livre de superfície e rugosidade (CHARMAN et al., 2009; HE et al., 2006; REDDING et al., 2009; SERRANO-GRANGER; CAMPO-TRAPERO; DEL RÍO-HIGHSMITH, 2005), sendo esses fatores envolvidos na adesão dos micro-organismos à superfície protética (PEREIRA-CENCI et al., 2008a). Segundo Seyfriedsberger, Rametsteiner# e Kern (2006), o fato de uma superfície possuir propriedades antimicrobianas

não necessariamente reduz a formação de biofilmes nessa superfície. Além da habilidade do composto presente na superfície interagir com o micro-organismo, outros fatores como rugosidade superficial, polaridade e hidrofiliicidade do substrato devem ser levados em consideração durante a formação do biofilme.

Um efeito mais significativo na redução da adesão dos micro-organismos era esperado como consequência da incorporação do MUPB. Entretanto, esse achado pode ser atribuído ao tempo de contato das espécies com o material (24 horas). Um aumento nesse tempo, bem como um aumento na concentração utilizada, pode tornar a ação do monômero mais eficiente.

Devido à capacidade do MUPB de se ligar aos grupamentos metacriloil à semelhança do MDPB (IMAZATO et al., 1994; KURARAY COMPANY, 1995), do DMAE-CB (LI et al., 2009) e do TBAEMA (THOMASSIM et al., 2007), não esperamos que a atividade antimicrobiana do MUPB diminua com o tempo, assim como ocorreu para os materiais contendo nistatina (CHOW; MATEAR; LAWRENCE, 1999; EL-CHARKAWI et al., 1994), triclosan (LEFEBVRE et al., 2001), clorexidina (ADDY, 1981; AMIN et al., 2009; LAMB; MARTIN, 1983;), zeólitos (CASEMIRO et al., 2008; KAWAHARA et al., 2000) ou que foram submetidos ao glazeamento da superfície (SESMA et al., 2005).

Um fator limitante em nosso estudo é a avaliação de espécies isoladas, ao invés de investigar o efeito do MUPB sobre comunidades complexas como os biofilmes. A interação entre diferentes espécies poderia influenciar a formação de biofilme sobre a resina acrílica (PEREIRA-CENCI et al., 2008a, 2008b). Thein, Samaranayake e Samaranayake (2006) encontraram interação de forma complexa entre 8 diferentes espécies bacterianas e a *C. albicans* na modulação da matriz do biofilme bacteriano/fúngico. Assim testes in vitro de formação de biofilme sob espécimes contendo o monômero experimental, associando espécies fúngicas com espécies bacterianas aeróbias e anaeróbias, deveriam ser realizados no intuito de verificar se o efeito do MUPB incorporado sob condições mais próximas àquelas encontradas na cavidade bucal.

Os resultados da incorporação do MUPB à resina acrílica testada foram promissores, mostrando que um material para base de prótese removível que apresente propriedades antimicrobianas, sem que os componentes biocidas sejam liberados, pode ser obtido. Entretanto, inúmeros aspectos ainda necessitam ser investigados até que seja possível concluir

sobre a viabilidade do seu uso clinicamente. Um primeiro fator que pode ser levantado como uma limitação foi a não incorporação de concentrações maiores de MUPB. A princípio, buscou-se quantidades próximas às de MDPB testadas por Imazato et al. para resinas compostas (IMAZATO et al., 1992, 1994) e para resina de base de prótese (KURARAY COMPANY, 1995). Lefebvre et al. (2001) também apontaram a baixa concentração de triclosan incorporado ao material reembasador como uma das limitações envolvidas na ausência de efeito desse composto sobre a adesão microbiana, indicando a necessidade de estudos com maior concentração do produto. Entretanto, apesar de quantias mais elevadas poderem ter resultados mais favoráveis quanto à inibição da adesão microbiana, esse aumento têm potencial de comprometer outras propriedades, como observado para o TBAEMA (PALEARI, 2009) e outros compostos (AKIBA et al., 2005; CASEMIRO et al., 2008; DHIR et al., 2007; PARK et al., 2009; SHIBATA et al., 2007), e ainda ser economicamente inviável para a confecção de próteses removíveis.

Mesmo se a resina acrílica passar a apresentar atividade antimicrobiana, seu uso não seria clinicamente viável caso suas propriedades originais sejam prejudicadas pela adição de um monômero antimicrobiano. Assim, outros estudos poderiam avaliar alterações nas propriedades inerentes à resina acrílica, em decorrência da incorporação do MUPB. Propriedades como resistência flexural, rugosidade superficial, dureza Vickers e estabilidade de cor da resina acrílica foram investigadas por nosso grupo de pesquisa e estão em processo de publicação. Outros aspectos das resinas acrílicas contendo MUPB deveriam ser investigados, como sua compatibilidade com dentes artificiais e materiais reembasadores, porosidade e sorção de água, estabilidade dimensional, liberação de eluatos e possíveis mudanças na temperatura de transição vítrea ou demais propriedades térmicas.

Por fim, após um conhecimento das principais propriedades do MUPB incorporado em resina acrílica para base de prótese por meio de estudos *in vitro*, reforçamos a grande importância de estudos de biocompatibilidade em modelo animal seguidos de pequenos estudos *in situ*. Por fim, a avaliação desse monômero culminaria em ensaios clínicos referentes à eficácia e segurança dessas resinas como material para base de próteses, considerando-se que a formação de biofilme *in vitro* diferencia-se daquela formada *in vivo* em relação à colonização e adesão microbianas na superfície da resina acrílica (SESMA et al., 2005).

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

- 7.1) O MUPB apresentou concentrações inibitória e fugicida/bactericida mínimas comparáveis às do CCP, evidenciando seu potencial como agente antimicrobiano;
- 7.2) A citotoxicidade do MUPB foi em torno de 20 vezes maior que a do MMA, reforçando seu potencial como composto ativo;
- 7.3) Com relação à atividade antimicrobiana do MUPB incorporado a uma resina acrílica para base de próteses, pode-se concluir que o composto não age por liberação no meio. A presença do MUPB a 0,6% reduz a adesão de *C. albicans*, apesar de não ter efeito significativo para as outras espécies avaliadas.

Referências*

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

1. ABU-ELTEEN, K. H.; ABU-ALTEEN, R. M. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. **New Microbiologica**, Pavia, v. 21, n. 3, p. 41-48, Jan. 1998.
2. ADDY, M. In vitro studies into the use of denture base and soft liner materials as carriers for drugs in the mouth. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 131-142, Mar. 1981.
3. AKIBA, N.; HAYAKAWA, I.; KEH, E. S.; WATANABE, A. Antifungal effects of a tissue conditioner coating agent with TiO₂ photocatalyst. **Journal of Medical and Dental Sciences**, Tokyo, v. 52, n. 4, p. 223-227, Dec. 2005.
4. AMBJORNSSEN, E.; RISE, J. The effect of verbal information and demonstration on denture hygiene in elderly people. **Acta Odontologica Scandinavica**, Oslo, v. 43, n. 1, p. 19-24, Mar. 1985.
5. AMIN, W. M.; AL-ALIB, M. H.; SALIMB, N. A.; AL-TARAWNEHB, S. K. A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis. **European Journal of Dentistry**, Ankara, v. 3, n. 4, p. 257-266. Oct. 2009.
6. BEYTH, N.; YUDOVIN-FARBERB, I.; BAHIRA, R.; DOMBB, A. J.; WEISSA, E. I. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. **Biomaterials**, Guilford, v. 27, n. 21, p. 3995-4002, Mar. 2006.
7. BRANTING, C.; SUND, M. L.; LINDER, L. E. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 347-353, 1989.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Saúde Bucal. **Projeto SB Brasil: Condições de Saúde Bucal da População Brasileira 2002-2003 – Resultados Principais**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2004. 68 p.
9. CAMPANHA, N. H.; PAVARINA, A. C.; GIAMPAOLO, E. T.; MACHADO, A. L.; CARLOS, I. Z.; VERGANI, C. E. Cytotoxicity of hard chairside reline resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. **International**

- Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 19, n. 2, p. 195-201, Mar-Apr. 2006.
10. CAMPOS, M. S.; MARCHINI, L.; BERNARDES, L. A.; PAULINO, L. C.; NOBREGA, F. G. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 23, n. 5, p. 419-424, Oct. 2008.
 11. CARLSSON, G. E. Clinical morbidity and sequelae of treatment with complete dentures. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 79, n. 1, p. 17-23, Jan. 1998.
 12. CARLSSON, J.; SÖDERHOLM, G.; ALMFELDT, I. Prevalence of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* in the mouth of persons wearing full-dentures. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 243-249, Mar. 1969.
 13. CASEMIRO, L. A.; GOMES MARTINS, C. H.; PIRES-DE-SOUZA, F. DE C.; PANZERI, H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. **Gerodontology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 187-194, Sep. 2008.
 14. CHARMAN, K. M.; FERNANDEZ, P.; LOEWY, Z.; MIDDLETON, A. M. Attachment of *Streptococcus oralis* on acrylic substrates of varying roughness. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 472-477, Apr. 2009.
 15. CHOW, C. K.; MATEAR, D. W.; LAWRENCE, H. P. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. **Gerodontology**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 110-119, Dec. 1999.
 16. COMPAGNONI, M. A.; SOUZA, R. F.; MARRA, J.; PARO, A. C.; BARBOSA, D. B. Relationship between *Candida* and the nocturnal denture wear: quantitative study. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 600-605, Aug. 2007.
 17. COSTA, C., A., S. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: ESTRELA, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. cap. 9, p.145-60.
 18. CUNHA, T. R.; REGIS, R. R.; BONATTI, M. R.; SOUZA R. F. Influence of incorporation of fluoroalkyl methacrylates on roughness and flexural strength of a

- denture base acrylic resin. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 17, n. 2, p. 103-107, Mar-Apr. 2009.
19. DE SOUZA, R. D.; MORES, A. U.; CAVALCA, L.; ROSA, R. T.; SAMARANAYAKE, L. P.; ROSA, E. A. Cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* isolated from elder patients undergoing denture-related candidosis. **Gerodontology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 157-161, Jun. 2009.
 20. DHIR, G.; BERZINS, D. W.; DHURU, V. B.; PERIATHAMBY, A. R.; DENTINO, A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. **Journal of Prosthodontics**, Philadelphia, v. 16, n. 6, p. 465-472, Nov-Dec. 2007.
 21. DILLS, S. S.; OLSHAN, A. M.; GOLDNER, S.; BROGDON, C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 60, n. 4, p. 467-470, Oct. 1988.
 22. DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, Oct. 2001.
 23. EBI, N.; IMAZATO, S.; NOIRI, Y.; EBISU, S. Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 485-491, Nov. 2001.
 24. EDGERTON, M.; SCANNAPIECO, F. A.; REDDY, M. S.; LEVINE, M. J. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2644-2652, Jun. 1993.
 25. EL-CHARKAWI, H.; EL-SAID, E. A.; SAFOUH, H. M.; EL-RAGHI, N. Effect of addition antimicrobial agents to denture reliners. **Egyptian Dental Journal**, Cairo, v. 40, n. 3, p. 785-790, Jul. 1994.
 26. GEURTSSEN, W.; LEHMANN, F.; SPAHL, W.; LEYHAUSEN, G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. **Journal of Biomedical Material Research**, Cleveland, v. 41, n. 3, p. 474-480, Sep. 1998.

27. GIULIANA, G.; PIZZO, G.; MILICI, M. E.; MUSOTTO, G. C.; GIANGRECO R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 68, n.8, p.729-733, Aug. 1997.
28. HANKS, C. T.; STRAWN, S. E.; WATAHA, J. C.; CRAIG, R. G. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 70, n. 11, p. 1450-1455, Nov. 1991.
29. HE, X. Y.; MEURMAN, J. H.; KARI, K.; RAUTEMAA, R.; SAMARANAYAKE, L. P. *In vitro* adhesion of *Candida* species to denture base materials. **Mycoses**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 80-84, Mar. 2006.
30. HIROTA, K.; MURAKAMI, K.; NEMOTO, K.; MIYAKE, Y. Coating of surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) co-polymer significantly reduces retention of human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 248, n. 1, p. 37-45, Jul. 2005.
31. HOTTA, M.; NAKAJIMA, H.; YAHAMOTO, K.; AONO M. Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 467-470, Jul. 1998.
32. IGNATOVA, M.; VOCCIA, S.; GILBERT, B.; MARKOVA, N.; COSSEMENT, D.; GOUTTEBARON, R.; JÉRÔME, R.; JÉRÔME, C. Combination of electrografting and atom-transfer radical polymerization for making the stainless steel surface antibacterial and protein antiadhesive. **Langmuir**, Washington, v. 22, n. 1, p. 255-262, Jan. 2006.
33. IMAZATO, S.; EBI, N.; TARUMI, H.; RUSSELL, R. R.; KANEKO, T.; EBISU, S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. **Biomaterials**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 899-903, May 1999.
34. IMAZATO, S.; EHARA, A.; TORII, M.; EBISU, S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. **Journal of Dentistry**, Guildford, v. 26, n. 3, p. 267-271, Mar. 1998.
35. IMAZATO, S.; IMAI, T.; RUSSELL, R. R.; TORII, M.; EBISU, S. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an

- adhesion-promoting monomer. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 39, n. 4, p. 511-515, Mar. 1998.
36. IMAZATO, S.; KAWAKAMI, M.; TORII, M.; TSUCHITANI, Y. Antibacterial activity of composites containing chemically bound non-releasing antibacterial component (abstract). **Journal of Dental Research**, Washington, v. 71, p. 721, 1992.
 37. IMAZATO, S.; KINOMOTO, Y.; TARUMI, H.; EBISU, S.; TAY, F. R. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 19, n. 4, p. 313-319, Jun. 2003.
 38. IMAZATO, S.; KINOMOTO, Y.; TARUMI, H.; TORII, M.; RUSSELL, R. R.; MCCABE, J. F. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 76, n. 3, p. 768-772, Mar. 1997.
 39. IMAZATO, S.; KURAMOTO, A.; TAKAHASHI, Y.; EBISU, S.; PETERS, M. C. *In vitro* antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 22, n. 6, p. 527-532, Jun. 2006.
 40. IMAZATO, S.; OHMORI, K.; RUSSELL, R. R.; MCCABE, J. F.; MOMOI, Y.; MAEDA, N. Determination of bactericidal activity of antibacterial monomer MDPB by a viability staining method. **Dental Materials Journal**, Tokyo, v. 27, n. 1, p. 145-148, Jan. 2008.
 41. IMAZATO, S.; RUSSELL, R. R. B.; MCCABE, J. F. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. **Journal of Dentistry**, Guildford, v. 23, n. 3, p. 177-181, Jun. 1995.
 42. IMAZATO, S.; TARUMI, H.; EBI, N.; EBISU, S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. **Journal of Dentistry**, Guildford, v. 28, n. 1, p. 61-67, Jan. 2000.
 43. IMAZATO, S.; TORII, M.; TSUCHITANI, Y.; MCCABE, J. F.; RUSSEL, R. R. B. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 73, n. 8, p. 1437-1443, Aug. 1994.
 44. IMAZATO, S.; TORII, Y.; TAKATSUKA, T.; INOUE, K.; EBI, N.; EBISU, S.

- Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 314-319, Apr. 2001.
45. IMAZATO, S.; WALLS, A. W.; KURAMOTO, A.; EBISU, S. Penetration of an antibacterial dentine-bonding system into demineralized human root dentine *in vitro*. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 110, n. 2, p. 168-174, Apr. 2002.
46. JAGGER, D. C.; HARRISON, A. Denture cleansing—the best approach. **British Dental Journal**, London, v. 178, n. 11, p. 413-417, Jun. 1995.
47. JAMES, A.; BEAUDETTE, L.; COSTERTON, W. Interspecies bacterial interactions in biofilms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 15, n. 4, p. 257-262, Oct. 1995.
48. JORGE, J. H.; GIAMPAOLO, E. T.; PAVARINA, A. C. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 33, n. 2, p. 65-68, apr-jun. 2004.
49. KAWAHARA, K.; TSURUDA, K.; MORISHITA, M.; UCHIDA, M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic condition. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 16, n. 6, p. 452-455, Nov. 2000.
50. KENG, S. B.; LIM, M. Denture plaque distribution and the effectiveness of a perborate-containing denture cleanser. **Quintessence International**, Berlin, v. 27, n. 5, p. 341-345, May 1996.
51. KORKMAZ, Y.; OZALP, M.; ATTAR, N. Comparison of the Antibacterial Activity of Different Self-etching Primers and Adhesives. **Journal of Contemporary Dental Practice**, Cincinnati, v. 9, n. 7, p. 57-64, Nov. 2008.
52. KOURAI, H.; YABUHARA, T.; SHIRAI, A.; MAEDA, T.; NAGAMUNE, H. Syntheses and antimicrobial activities of a series of new bis-quaternary ammonium compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 41, n. 4, p. 437-444, Apr. 2006.

53. KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 2, p. 878-888, Feb. 2002.
54. KURARAY COMPANY. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, Nishida K, Yamauchi J. **Antimicrobial polymerizable composition, the polymer and article obtained from the same**. US 5408022. 18 Apr. 1995.
55. LAMB, D. J.; MARTIN, M. V. An *in vitro* and *in vivo* study of the effect of incorporation of chlorhexidine into autopolymerizing acrylic resin plates upon the growth of *Candida albicans*. **Biomaterials**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 205-209, Jul. 1983.
56. LEFEBVRE, C. A.; WATAHA, J. C.; CIBIRKA, R. M.; SCHUSTER, G. S.; PARR, G. R. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 85, n. 4, p. 352-356, Apr. 2001.
57. LENOIR, S.; PAGNOULLE, C.; GALLEN, M.; COMPÈRE, P.; JÉRÔME, R.; DETREMBLEUR, C. Polyolefin matrixes with permanent antibacterial activity: preparation, antibacterial activity, and action mode of the active species. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 8, p. 2291-2296, Aug. 2006.
58. LI, F.; CHEN, J.; CHAI, Z.; ZHANG, L.; XIAO, I.; FANG, M.; MA, S. Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. **Journal of Dentistry**, Guildford, v. 37, n. 4, p. 289-296, Apr. 2009.
59. LIAU, S. Y.; READ, D. C.; PUGH, W. J.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 279-283, Oct. 1997.
60. LIN, J. J.; CAMERON, S. M.; RUNYAN, D. A.; CRAFT, D. W. Disinfection of denture base acrylic resin. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 81, n. 2, p. 202-206, Feb. 2006.

61. LU, G. Q.; WU, D. C.; FU, R. W. Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. **Reactive & Functional Polymers**, Amsterdam, v. 67, n. 4, p. 355-366, Apr. 2007.
62. LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 110, n. 9, p. 601-610, Sep. 2002.
63. MACNEILL, S.; RINDLER, E.; WALKER, A.; BROWN, A. R.; COBB, C. M. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*: an *in vitro* study. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 24, n. 10, p. 753-760, Oct. 1997.
64. MARCHINI, L.; TAMASHIRO, E.; NASCIMENTO, D. F.; CUNHA, V. P. Self-reported denture hygiene of a sample of edentulous attendees at a University dental clinic and the relationship to the condition of the oral tissues. **Gerodontology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 226-228, Dec. 2004.
65. MARSH, P. D.; PERCIVAL, R. S.; CHALLACOMBE, S. J. The Influence of Denture-wearing and age on the oral microflora. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 71, n. 7, p. 1374-1381, Jul. 1992.
66. MATSUURA, T.; ABE, Y.; SATO, Y.; OKAMOTO, K.; UESHIGE, M.; AKAGAWA, Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. **Journal of Dentistry**, Guildford, v. 25, n. 5, p. 373-377, Sep. 1997.
67. MONTEIRO, D. R.; GORUP, L. F.; TAKAMIYA, A. S.; RUVOLLO-FILHO, A. C.; DE CAMARGO, E. R.; BARBOSA, D. B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 103-110, Aug. 2009.
68. MORISHITA, M.; MIYAGI, M.; YAMASAKI, U.; TSURUDA, K.; KAWAHARA, K.; IWAMATO, Y. Pilot study on the effect of a mouthrinse containing silver zeolite

- on plaque formation. **Journal of Clinical Dentistry**, Copenhagen, v. 9, n. 4, p. 94-96, Feb. 1998.
69. MOURA, J. S.; SILVA, W. J.; PEREIRA, T.; DEL BEL CURY, A. A.; RODRIGUES GARCIA, R. C. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 96, n. 3, p. 205-211, Sep. 2006.
70. MURTOMAA, H.; MEURMAN, J. H. Mechanical aids in the preventions of dental diseases in the elderly. **International Dental Journal**, London, v. 42, n. 5, p. 365-372, Oct. 1992.
71. NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMAMOTO, T. Denture plaque – past and recent concerns. **Journal of Dentistry**, Guildford, v. 26, n. 4, p. 299-304, May 1998.
72. NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; KUMAGAI, H. A review of *in vitro* and *in vivo* methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 12, n. 2, p. 153-159, Mar-Apr. 1999.
73. NIKAWA, H.; NISHIMURA, H.; MAKIHIRA, S.; HAMADA, T.; SADAMORI, S.; SAMARANAYAKE, L. P. Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. **Mycoses**, Berlin, v. 43, n. 3-4, p. 139-143, May 2000.
74. NIKAWA, H.; YAMAMOTO, T.; HAMADA, T.; RAHARDJO, M. B.; MURATA, H.; NAKANODA, S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 350-357, May 1997.
75. NOHR, R.; MACDONALD, J. G. New biomaterials through surface segregation phenomenon: new quaternary ammonium compounds as antibacterial agents. **Journal of Biomaterials Science. Polymer edition**, Utrecht, v. 5, n. 6, p. 607-619, 1994.
76. OHMAN, S. C.; OSTERBERG, T.; DAHLÉN, G.; LANDAHL, S. The prevalence of *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* species, and *Candida* species and their relation to oral mucosal lesions in a group of 79-year-olds in Göteborg. **Acta Odontologica Scandinavica**, Oslo, v. 53, n. 1, p. 49-54, Feb. 1995.

77. PARANHOS, H. F.; SILVA-LOVATO, C. H.; SOUZA, R. F.; CRUZ, P. C.; FREITAS, K. M.; PERACINI, A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 606-612, Aug. 2007.
78. PARK, S. E.; BLISSETT, R.; SUSARLA, S. M.; WEBER H. P. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. **Journal of Prosthodontics**, Philadelphia, v. 17, n. 5, p. 365-369, Jul. 2008.
79. PARK, S. E.; CHAO, M.; RAJ, P. A. Mechanical properties of surface-charged poly(methyl methacrylate) as denture resins. **International Journal of Dentistry**, London, v. 2009, p. 1-6. doi:10.1155/2009/841431.
80. PARK, S. E.; PERIATHAMBY, A. R.; LOZA, J. C. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. **Journal of Prosthodontics**, Philadelphia, v. 12, n. 4, p. 249-254, Dec. 2003.
81. PEREIRA-CENCI, T.; DEL BEL CURY, A. A.; CRIELAARD, W.; TEN CATE, J. M. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 16, n. 2, p. 86-94, Apr. 2008.
82. PEREIRA-CENCI, T.; DENG, D. M.; KRANEVELD, E. A.; MANDERS, E. M.; DEL BEL CURY, A. A.; TEN CATE, J. M.; CRIELAARD, W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 53, n. 8, p. 755-764, Aug. 2008.
83. PESCI-BARDON, C.; FOSSE, T.; MADINIER, I.; SERRE, D. *In vitro* new dialysis protocol to assay the antiseptic properties of a quaternary ammonium compound polymerized with denture acrylic resin. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 226-231, Jul. 2004.
84. PESCI-BARDON, C.; FOSSE, T.; SERRE, D.; MADINIER, I. *In vitro* antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. **Gerodontology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 111-116, Jun. 2006.

85. PIETROKOVSKI, J.; AZUELOS, J.; TAU, S.; MOSTAVOY, R. Oral findings in elderly nursing home residents in selected countries: oral hygiene conditions and plaque accumulation on denture surfaces. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 73, n. 2, p. 136-141, Feb. 1995.
86. PURI, G.; BERZINS, D. W.; DHURU, V. B.; RAJ, P. A.; RAMBHIA, S. K.; DHIR, G.; DENTINO, A. R. Effect of phosphate group addition on the properties of denture base resins. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 100, n. 4, p. 302-308, Oct. 2008.
87. QUINN, D. M. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 177-182, Mar. 1985.
88. RADFORD, D. R.; CHALLACOMBE, S. J.; WALTER, J. D. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials *in vivo* and *in vitro*. **Critical Reviews in Oral Biology Medicine**, Boca Raton, v. 10, n. 1, p. 99-116, 1999.
89. RAMAGE, G.; TOMSETT, K.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; REDDING, S. W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v. 98, n. 1, p. 53-59, Jul. 2004.
90. RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Madrid, v. 18, n. 4, p. 163-170, Dec. 2001.
91. RATANASATHIEN, S.; WATAHA, J. C.; HANKS, C. T.; DENNISON, J. B. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 74, n. 9, p. 1602-1606, Sep. 1995.
92. REDDING, S.; BHATT, B.; RAWLS, H. R.; SIEGEL, G.; SCOTT, K.; LOPEZ-RIBOT, J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v. 107, n. 5, p. 669-672, May 2009.

93. RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B. Antimicrobial activity and action of silver. **Progress in Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 31, p. 351-370, Jan. 1994.
94. SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W. An in vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 25, n. 8-9, p. 603-609, 1980.
95. SAMARANAYAKE, Y. H.; WU, P. C.; SAMARANAYAKE, L. P.; SO, M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 103, n. 10, p. 707-713, Oct. 1995.
96. SCHNEID, T. R. An *in vitro* analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. **Special Care in Dentistry**, Chicago, v. 12, n. 6, p. 245-250, Nov-Dec. 1992.
97. SCULLY, C.; EL-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida* and oral candidosis: a review. **Critical Reviews in Oral Biology Medicine**, Boca Raton, v. 5, n. 2, p. 125-157, 1994.
98. SERRANO-GRANGER, R.; CERERO-LAPIEDRA, R.; CAMPO-TRAPERO, J.; DEL RÍO-HIGHSMITH, J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 18, n. 5, p. 392-398, Sep-Oct. 2005.
99. SESMA, N.; LAGANÁ, D. C.; MORIMOTO, S.; GIL, C. Effect of denture surface glazing on denture plaque formation. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 2, p. 129-134, May-Aug. 2005.
100. SEYFRIEDSBERGER, G.; RAMETSTEINER, K.; KERN, W. Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. **European Polymer Journal**, Pessac, v.42, n. 12, p. 3383-3389, Dec. 2006.
101. SHIBATA, T.; HAMADA, N.; KIMOTO, K.; SAWADA, T.; SAWADA, T.; KUMADA, K.; UMEMOTO, T.; TOYODA, M. Antifungal effect of acrylic resin

- containing apatite-coated TiO₂ photocatalyst. **Dental Materials Journal**, Tokyo, v. 26, n. 3, p. 437-444, May 2007.
- 102.SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em:15 out. 2009.
- 103.SILVA, L.; COUTINHO, A.; FEDOROV, A.; PRIETO, M. Nystatin-induced lipid vesicles permeabilization is strongly dependent on sterol structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1758, n. 4, p. 452-459, Apr. 2006.
- 104.STOLF, D. O. **Influência da impregnação com estireno e com metacrilato de metila em propriedades físicas e mecânicas da madeira de *Eucalyptus grandis* e de *Pinus caribaea* var. *hondurensis***. 2005. 125f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos: Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- 105.THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 672-680, Aug. 2006.
- 106.THOMASSIN, J. M.; LENOIR, S.; RIGA, J.; JÉRÔME, R.; DETREMBLEUR, C. Grafting of poly[2-(tert-butylamino)ethyl methacrylate] onto polypropylene by reactive blending and antibacterial activity of the copolymer. **Biomacromolecules**, Washington, v. 8, n. 4, p. 1171-1177, Mar. 2007.
- 107.THURMAN, R. B.; GERBA, C. P. The molecular mechanisms of copper and silver in disinfection of bacteria and viruses. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Ohio, v. 18, n. 4, p. 295-315, 1989.
- 108.TRIRATANA, T.; RUSTOGI, K. N.; VOLPE, A. R.; DEVIZIO, W.; PETRONE, M.; GINIGER, M. Clinical effect of a new liquid dentifrice containing triclosan/copolymer on existing plaque and gingivitis. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 133, n. 2, p. 219-225, Feb. 2002.
- 109.TRUHLAR, M. R.; SHAY, K.; SOHNLE, P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 71, n. 5, p. 517-524, May 1994.

- 110.URBAN, V. M.; SOUZA, R. F.; ARRAIS, A. G.; BORSATO, K. T.; VAZ, L. G.
Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. **Journal of Prosthodontics**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 295-299, Sep-Oct. 2006.
- 111.WEBB, B. C.; THOMAS, C. J.; WILLCOX, M. D.; HARTY, D. W.; KNOX, K. W.
Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Australian Dental Journal**, Sidney, v. 43, n. 1, p. 45-50, Feb. 1998.
- 112.WENDT, D. C. How to promote and maintain good oral health in spite of wearing dentures. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 53, n. 6, p. 805-807, Jun. 1985.
- 113.WILSON, S. J.; WILSON, H. J. The release of chlorhexidine from modified dental acrylic resin. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 311–319, May 1993.
- 114.XIAO, Y. H.; CHEN, J. H.; FANG, M.; XING, X. D.; WANG, H.; WANG, Y. J.; LI, F. Antibacterial effects of three experimental quaternary ammonium salt (QAS) monomers on bacteria associated with oral infections. **Journal of Oral Science**, Tokyo, v. 50, n. 3, p. 323-327, Sep. 2008.
- 115.YILDIRIM, M. S.; HASANREISOGLU, U.; HASIRCI, N.; SULTAN, N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 518-525, Jul. 2005.
- 116.YILDIRIM, M. S.; KESIMER, M.; HASIRCI, N.; KILIÇ, N.; HASANREISOĞLU, U. Adsorption of human salivary mucin MG1 onto glow-discharge plasma treated acrylic resin surfaces. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 33, n. 10, p. 775-783, Oct. 2006.
- 117.YOSHIKAWA, K.; CLARK, D. T.; BRAILSFORD, S. R.; BEIGHTON, D.; WATSON, T. F.; IMAZATO, S.; MOMOI, Y. The effect of antibacterial monomer MDPB on the growth of organisms associated with root caries. **Dental Materials Journal**, Tokyo, v. 26, n. 3, p. 388-392, May 2007.