

RENNAN LUIZ OLIVEIRA DOS SANTOS

**Estudo da eficiência antifúngica do biocida poli(cloreto de dialildimetilamônio)
incluído em resinas acrílicas a base de polimetilmetacrilato**

São Paulo

2020

RENNAN LUIZ OLIVEIRA DOS SANTOS

**Estudo da eficiência antifúngica do biocida poli(cloreto de dialildimetilamônio)
incluído em resinas acrílicas a base de polimetilmetacrilato**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula

Co orientador: Norberto Nobuo Sugaya

São Paulo

2020

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Santos, Rennan Luiz Oliveira dos.

Estudo da eficiência antifúngica do biocida poli (cloreto de dialildimetilamônio) incluído em resinas acrílicas a base de polimetilmetacrilato / Rennan Luiz Oliveira dos Santos; orientador Claudete Rodrigues Paula; coorientador Norberto Nobuo Sugaya. -- São Paulo, 2020.

78 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida.

1. Resinas acrílicas. 2. Biocida. 3. Antifúngicos. 4. Materiais dentários. I. Paula, Claudete Rodrigues. II. Sugaya, Norberto Nobuo. III. Título.

Dos Santos RLO. Estudo da eficiência antifúngica do biocida poli (cloreto de dialildimetilamônio) incluído em resinas acrílicas a base de polimetilmetacrilato, São Paulo. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 15/06/2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Neide Pena Coto

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Andréa Lusvarghi Witzel

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Luciana da Silva Ruiz Menezes

Instituição: Núcleo de Ciências Biomédicas - CLR II Bauru

Julgamento: Aprovado

Dedico essa tese ao meu pai, Luiz José dos Santos Filho. A quem devo grande parte da minha vida e por querer que estivesse de corpo presente no dia da minha defesa.

Sei que o senhor está me protegendo! Muito obrigado por tudo! Te amo eternamente!

“A sanfona nunca vai desafinar!”

AGRADECIMENTOS

“O homem não teria alcançado o possível se vezes não tivesse tentado o impossível.”

- Max Weber

Começo os meus agradecimentos partindo dessa frase, pois retrata fortemente minha caminhada até aqui. Sou um homem que veio do interior de Pernambuco, nunca fui o mais inteligente das salas de aula por onde passei, considerado por muitas vezes fora do padrão e com um punhado de sonhos enormes.

Desde criança eu sempre falei que ensinar me fascinava e me deixava feliz. Como todos sabem, ser professor no nosso país não é nada fácil e, com isso, onde eu passava era desencorajado sobre a escolha dessa profissão. O tempo passou, fui crescendo e a esperança de um dia conseguir almejar isso também. Lembro-me durante a oitava série, quando fui questionado sobre a faculdade, eu falei: Quero ser professor. Mais uma vez os olhos se viraram contra mim espantados. Além de estar fora dos padrões ainda queria ser professor, muitos pensaram, um completo fracasso.

Veio o ensino médio e o menino fora dos padrões tornou-se um “padrãozinho” e quase tudo mudou... Porém aquela vontade de ser professor continuava firme, mas agora pertencendo à outra “casta” do meu colégio, falar que queria ser professor era quase como assinar o atestado de fracassado.

Veio o vestibular e as dúvidas se mantiveram. Decidi fazer odontologia por influência da família e vendo que o mercado de trabalho era favorável. Não era o cotado para passar e mais uma vez fui subestimado. Lembro que no meu ano de vestibular, poucos passaram em cursos concorridos. Fui um deles. Passei de primeira nas duas faculdades públicas de Pernambuco. Que felicidade.

Veio à faculdade trazendo um novo ciclo, uma nova cidade e novas pessoas. Sai do interior para capital tão inocente e feliz, mais uma vez fui taxado de tolo. Durante a faculdade aprendi muito. Aprendi muito bem sobre minha profissão, mas também aprendi com os melhores que ela não é uma profissão para fracos. Dentro da odontologia se você quiser ser bem sucedido, você tem que ser forte. Vendo isso, lutei... Fui chefe de liga acadêmica, monitor de 4 disciplinas, bolsista de IC durante 4

anos e de todos os órgãos financiadores da época, e apresentei o TCC no nono período.

Adivinhem porque antecipei meu TCC? Porque queria fazer o mestrado. Claro, eu poderia ser dentista e PROFESSOR! Mas não era um mestrado qualquer. Sonhava grande! Queria fazer o mestrado na melhor faculdade do meu país. Mais uma vez escutei de muitos o quanto era eu tolo e o quanto seria difícil.

Vim fazer prova e pouquíssimas pessoas me apoiaram, posso dizer até que por muitas vezes me senti sozinho. Lembro-me do dia da prova onde eu havia estudado MUITO e escrevi 18 folhas frente e verso. Eu era o mais novo da prova, tinha 24 anos. As outras pessoas já com suas especializações, consultórios e eu tinha acabado de sair do meu baile de formatura. Fiquei tenso! Acho que nunca fiquei tão nervoso! O resultado saia no mesmo dia e passei. QUE FELICIDADE. Fiquei tão feliz que até perdi o voo de volta para PE.

Veio o mestrado e mais uma vez fui taxado de tolo. Era uma criança no meio de gente grande. Eu só queria aprender e ensinar... Demorei a entender o contexto da pós-graduação/academia. Entrei muito verde e sofri muito. Confesso que esse foi o tempo mais difícil da minha vida. Sofri preconceito e fui humilhado. Entre trancos e barrancos, terminei o mestrado. Eu estava totalmente desestimulado, desacreditado e certo que esse mundo não era para mim.

Pensei em voltar para PE várias vezes, mas me convenceram que era melhor fazer o doutorado antes de voltar. Fiz então a seleção do doutorado, mais uma vez falaram: Você vai tentar no Diagnóstico Bucal? A seleção deles é MUITO difícil. Pensei comigo mesmo: Já passei por tanta coisa, uma a mais não vai fazer diferença. Fui, fiz e passei!

Quando entrei no doutorado, estava em depressão e com crises de ansiedades constantes. Após acompanhamento adequado entendi que eu devia muito a mim mesmo. Olhei para trás e percebi que não podia desistir de tudo, muito menos de mim mesmo. Lutei, me soergui e sai do que me atormentava. Livrei-me das algemas e das culpas que nunca foram minhas. Senti-me livre e vitorioso.

Hoje, terminando o meu doutorado, sinto uma grande sensação de dever cumprido... Sinto-me feliz. Sinto-me leve. Sinto-me maduro. Sinto-me forte. Sinto-me extasiado. Sinto-me grato e, por isso, gostaria de agradecer de um por um.

Começo agradecendo a Deus e a Virgem Maria, minha santa de devoção, muito obrigado por nunca me desamparar e por sempre escutar as minhas preces.

Eu costumo dizer que eu só tenho medo do futuro, se eu tivesse esquecido meu passado. Muito obrigado!

Agradeço aos meus pais, Luiz Santos <3 e Fátima Santos <3, e ao meu irmão, Ruan Henrique, que apesar de não entender o porquê do seu filho ter escolhido esse caminho tão árduo e difícil, me apoiaram e me incentivaram da maneira que podiam.

Agradeço aos meus avós, a que está nesse plano e aos que já se foram, por sempre zelar por mim desde pequeno e por sempre me trazer o sentimento de orgulho do neto que tem. Vocês me deram muita força para lutar durante minha vida.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra Claudete Rodrigues Paula, onde tenho a liberdade de chamar de amiga/mãe. Muito obrigado por todo conhecimento passado, por todos os momentos nos quais me acalmou, por todas as risadas e conversas jogadas fora. Considero-me abençoado por ter encontrando-a no meu caminho. Saiba que a senhora será para sempre minha eterna orientadora.

Agradeço ao meu co-orientador Professor Dr Norberto Nobuo Sugaya. Agradeço, obviamente, por todo conhecimento passado, mas o meu principal agradecimento é por me permitir conviver com você, pessoa na qual irei me espelhar. O senhor me ensinou muito mais que Estomatologia, o senhor me ensinou sobre o meio acadêmico e como levar a vida, me fazendo assim amadurecer. Muito obrigado.

Agradeço a todos os meus professores que contribuíram diretamente e indiretamente com minha formação durante o doutorado: os professores disciplina de Estomatologia Clínica, a Professora Neide Pena Coto, a Professora Karen Ortega, a Professora Carina Domaneschi e a Professora Mainie. Muito obrigado pelas palavras de apoio, puxões de orelhas e seus ensinamentos.

Agradeço a todos os meus amigos! Os #bucos, Os forasteiros, Powerpuff girls, Lua em algum signo, Santinhos da PBMF, MexiCana, PartiuPetro, Severinos, Coração da tia Andrea, Dentistas abusados, O grupo da patologia, As queridas da academia, Isabela Heraclio, Laís Máximo, Tia Ceça, Duda Miss, Gabi Madeira, Romeyka, Leorik, Jefferson Tenório, Tia Val, Ligia Gonzaga, Ivan Onone, Fernanda Bruno, Alyne Nathalier, Ana Hoyos, Juvenal (Em memória), Eliane Revoredo, Giovana Sarra... Desculpe se esqueci de alguém. Quem é meu amigo sabe o quanto eu prezo por isso e se você não foi citado, saiba que apesar do meu esquecimento meu coração está grato!

Sabendo que o sucesso não se alcança sozinho, agradeço as parceiras: CONTROLBIO (Em especial a pessoa maravilhosa na qual é a Professora Mazé), Grupo de leveduras patogênicas - CNPQ, Laboratório de Interação entre macromoléculas e superfícies – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Hospital do Câncer de Pernambuco – Departamento de Odontologia, Instituto Adolf Lutz – São Paulo (Capital), Instituto Adolf Lutz – Bauru/SP, Laboratório de pesquisa em Odontologia do Esporte e Biomecânica e o Banco de Células da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Sem vocês esse trabalho e tantos outros não seriam finalizados. Agradeço pela oportunidade de trabalhar com vocês, pelo apoio e responsabilidade que tiveram comigo.

Agradeço as professoras Neide Pena Coto, Carina Domaneschi e as “minhas” IC’s Victória, Helena, Mariana, Gabriela, Marcela e Ana por me conceder a oportunidade de aprender e aprimorar a arte de orientar.

Agradeço a todos os funcionários da FOU SP, em especial a Iracema, Laerte, Marília, Cecília, Joaquina, Glauce, Vania, Alessandra e Edson. Vocês são parte da FOU SP e fazem as coisas funcionarem. Muito obrigado por todas as conversas e apoio durante todo esse tempo.

Agradeço a todos os meus pacientes. Muito obrigado por permitir que ajudasse no processo de cura de vocês. Podem ter certeza que vocês me ensinaram e ajudaram a aprimorar muito mais do que odontologia, vocês me ensinaram sobre a vida.

E por fim, quero dizer que apesar dos percalços, aquele menino que sempre quis ser professor continua vivo dentro de mim. Parafraseando o meu querido Paulo Freire deixo claro que “para mim, é impossível existir sem sonho. A vida na sua totalidade me ensinou como grande lição que é impossível assumi-la sem risco.” Os riscos foram assumidos, as cartas foram lançadas e agora o fruto esta sendo colhido. Enfim, Doutor em Ciências pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Muito obrigado!

*“Sociedade em choque eu vim para incomodar
Aqui o santo é forte, é melhor se acostumar
Quem foi que disse que isso aqui não era pra mim se equivocou
Fui eu quem criei, vivi, escolhi me descobri e agora aqui estou.”*

- Karol Conka

RESUMO

Dos Santos RLO. Estudo da eficiência antifúngica do biocida poli(cloreto de dialildimetilamônio) incluído em resinas acrílicas a base de polimetilmetacrilato [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

A resina acrílica é usada em larga escala nos mais diversos setores inclusive na odontologia. Apesar dessa difusão, esse material sofre um problema sério frente a adesão de microrganismos em sua superfície. Visando isso, o presente trabalho elaborou um biomaterial baseado na incorporação do biocida Poli (cloreto de dialildimetilamônio) (PDADMAC) na massa de resinas acrílicas auto e termopolimerizável, avaliou suas propriedades antifúngicas e citotoxicidade. O PDADMAC foi incorporado nas resinas acrílicas e sua atividade antifúngica foi testada frente aos fungos *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404) seguindo os protocolos padrão G21-15 e E2149-13. Além disso, cepas isoladas da mucosa oral de pacientes sem doenças sistêmicas foram identificadas e a partir disso foram realizados os estudos de protease e de potencial antifúngico frente a essas cepas. Foram realizados também os testes de citotoxicidade utilizando o ensaio de redução de MTT em células-tronco de polpa dentária cultivadas em contato com meio de cultura condicionado pelas resinas. Os resultados demonstraram que ambas as resinas com PDADMAC exibiram eficácia significativa contra *Candida albicans*. Já com relação ao fungo *Aspergillus niger*, ficou evidente que esse material possui apenas eficácia fungistática. Com relação às cepas isoladas da mucosa oral de pacientes sem doenças sistêmicas, foi observado que a *Candida albicans* foi a mais prevalente e que independente da produção de protease produzidas por essas cepas as resinas acrescidas de PDADMAC são eficazes. Nos exames de citotoxicidade a adição do biocida nas resinas não afetou a viabilidade celular quando comparada às células cultivadas em condições ideais. Portanto, conclui-se que a incorporação de PDADMAC nas resinas acrílicas foi determinante para alcançar o efeito antifúngico desejado, mantendo a biocompatibilidade. Este estudo encontrou resultados promissores para o uso futuro deste biocida em materiais odontológicos.

Palavras-chave: Resinas acrílicas. Poli (cloreto de dialildimetilamônio). Biocida, Antifúngicos. Materiais dentários.

ABSTRACT

Dos Santos RLO. Study of the antifungal efficiency of the poly(diallyldimethylammonium chloride) biocide included in polymethylmethacrylate acrylic resins [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Acrylic resin is used on a large scale in the most diverse sectors including dentistry. Despite this diffusion, this material suffers a serious problem due to the adhesion of microorganisms on its surface. With this aim, the present study elaborated a biomaterial based on the incorporation of the biocide poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC) in the mass of self and thermopolymerizable acrylic resins, and evaluated its antifungal and cytotoxic properties. PDADMAC was incorporated into acrylic resins and its antifungal activity was tested against the fungi *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Aspergillus niger* (ATCC 16404), following the standard protocols G21-15 and E2149-13. In addition, strains isolated from the oral mucosa of patients without systemic diseases were identified and from that, protease and antifungal potential studies were performed against these strains. Cytotoxicity tests were also performed using the MTT reduction assay on dental pulp stem cells that were grown in contact with culture medium conditioned by resins. The results showed that both resins with PDADMAC exhibited significant efficacy against *Candida albicans*. Regarding the fungus *Aspergillus niger*, it was evident that this material has only fungistatic efficacy. Regarding strains isolated from the oral mucosa of patients without systemic diseases, we observed that *Candida albicans* was the most prevalent and that, regardless of the protease production made by these strains, resins with PDADMAC are effective. In cytotoxicity tests, the addition of biocide in resins did not affect cell viability when compared to cells grown under ideal conditions. Therefore, we concluded that the incorporation of PDADMAC in acrylic resins was decisive to achieve the desired antifungal effect, maintaining biocompatibility. This study found promising results for the future use of this biocide in dental materials.

Keywords: Acrylic resins. Poly(diallyldimethylammonium chloride). Biocide. Antifungals. Dental materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Paciente reabilitada com prótese facial com aparente proliferação microbiana. A: Proliferação microbiana na junção da prótese com a região glabellar. B: Proliferação microbiana por toda a extensão da prótese. Fonte: O autor.....	27
Figura 2.1 - Estrutura química do policloreto de dialildimetilamônio	30
Figura 2.2 - Estrutura química do tetrahidrofurano.....	31
Figura 2.3 - Microscopia de <i>Candida albicans</i>	33
Figura 2.4 - Estrutura macroscópica da <i>Candida albicans</i>	33
Figura 2.5 - <i>Aspergillus niger</i> em ágar com extrato de malte.....	35
Figura 2.6 - <i>Aspergillus niger</i> cultivado em ágar Sabouraud.....	35
Figura 4.1- Confeção dos corpos de prova de conformação quadrada. A: Adaptação da resina acrílica com o biocida na mufla. B: Prensagem em prensa hidráulica com duas toneladas. C: Acabamento dos corpos de prova pós desinclusão dos mesmos	40
Figura 4.2 - Área de degradação em albumina bovina frente à reação de protease	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Resultados dos corpos de prova frente *C. albicans* evidenciados através de fotografias. Amostra 1: CAAR+. Amostra 2: TAAR+53
- Tabela 5.2 - Resultados dos corpos de prova frente *A. niger* evidenciados através de fotografias. Amostra 1: CAAR+. Amostra 2: TAAR+.54
- Tabela 5.3 - Redução fúngica frente aos grupos testados CAAR, CAAR+, TAAR e TAAR+55
- Tabela 5.4 -Número de cepas de *Candida* identificadas de acordo com a sua espécie.....57
- Tabela 5.5 - Correlação entre as cepas, seu fator de virulência, os resultados nos testes antifúngicos frente aos fungos investigados e as cepas controle
.....58
- Tabela 5.6- Resultados dos corpos de prova frente *C. albicans* oriundas de mucosas jugal que estavam micotecadas no laboratório do grupo de pesquisa de leveduras patogênicas no CNPq evidenciando os resultados através de fotografias. Coluna superior: TAAR+. Coluna inferior: CAAR+59

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráficos 5.1- Avaliação do crescimento fúngico pelo protocolo G21-15 sendo o gráfico da esquerda frente ao fungo *C. albicans* e o da direita frente ao fungo *A. niger*.....51
- Gráfico 5.2 - Representação gráfica da viabilidade celular média (%) em função das concentrações de meios condicionados (%) para os diferentes grupos experimentais. As barras indicam erro padrão da média; * mostra diferença estatisticamente significativa entre TAAR e TAAR+ na mesma concentração ($p < 0.05$) 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
CAAR	Resina acrílica quimicamente ativada
CAAR+	Resina acrílica quimicamente ativada com aditivo do biocida
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CP	Corpos de prova
DPSC	Células-tronco de polpa dentária
E2149-13	Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions
FDA	Food and Drug Administration
G21-15	Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi
kGy	QuiloGray
MTT	(3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio)
PDADMAC	Poli (cloreto de dialildimetilamônio)
TAAR	Resina acrílica termicamente ativada
TAAR+	Resina acrílica termicamente ativada com aditivo do biocida
THF	Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

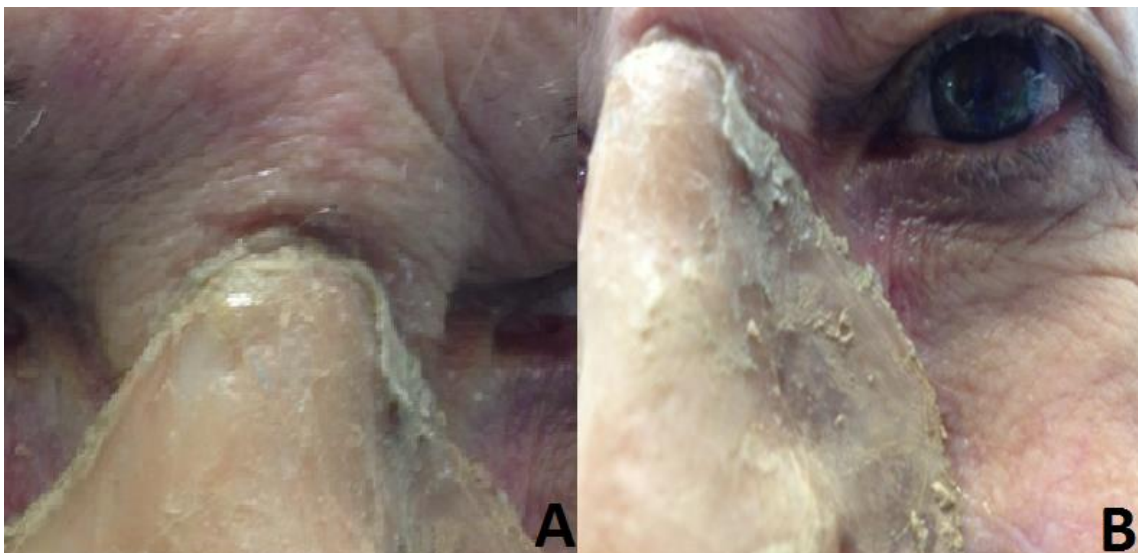
1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

As resinas acrílicas a base de polimetilmetacrilato são polímeros usados na odontologia em diversas finalidades, dentre elas a confecção de próteses adquire certo destaque. Esse importante papel dentro da odontologia foi adquirido graças a sua biocompatibilidade, seu custo, sua maleabilidade e fácil uso (1,2).

Essas resinas quando entram em contato com fluídos corpóreos sofrem desgastes, proliferação de microrganismos, perda da estética e algumas modificações no estado geral diminuindo assim sua longevidade em ótimas condições. (1,3,4,5). A proliferação de microrganismos, fungos e bactérias, compromete a estética protética e traz incomodo e inflamações na região onde o dispositivo foi instalado (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Paciente reabilitada com prótese facial com aparente proliferação microbiana. A: Proliferação microbiana na junção da prótese com a região glabellar. B: Proliferação microbiana por toda a extensão da prótese



Fonte: O autor.

Dentre as causas relacionadas à essa proliferação microbiana se destacam a falta de higiene dos pacientes, seu desgaste agregando ranhuras e a junção desses fatores. Com essa razão, periodicamente os pacientes buscam a troca ou reparo dos dispositivos confeccionados à base de resinas acrílicas (1,5).

Uma das grandes questões da sociedade moderna é o controle das proliferações e infecções microbianas. Atualmente, essa abordagem está cada vez mais difícil graças à resistência adquirida por esses microrganismos. Por isso, alguns agentes antimicrobianos foram testados e os resultados são os mais variados (6,7,8). A presença desses agentes na superfície de alguns materiais é capaz de resolver questões importantes como a proliferação de microrganismos nos equipamentos para intubação, na desinfecção de utensílios domésticos, proliferação da variada microbiota criada nas próteses, entre outros (2,5,9,10).

Para tanto, diferentes tipos de materiais podem atuar como matriz que alberga os agentes antimicrobianos. Porém, há a necessidade de analisar as características biológicas, físicas e químicas da matriz desses materiais, pois poderá haver uma grande influência sobre a atividade antimicrobiana definitiva (11).

Nessa tese foi utilizado o policloreto de dialildimetilamônio (PDADMAC), um agente que possui essa capacidade antimicrobiana inerente sendo usado no processo químico de purificação das águas. Já foi comprovado, em seu uso isolado, a eficácia contra os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium oxysporum* (11).

Em função do exposto e da experiência anteriormente acumulada pelo autor, a presente tese avaliou a eficácia antifúngica do biocida PDADMAC, diluído em tetrahidrofurano (THF), quando incorporado a resinas acrílicas, termoativadas (TAAR) e autoativadas (CAAR). Além disso, avaliou-se a citotoxicidade das resinas acrílicas acrescida do PDADMAC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESINAS ACRÍLICAS À BASE DE POLIMETILMETACRILATO E SEU USO NA ODONTOLOGIA

As resinas acrílicas a base de polimetilmetacrilato são materiais de estrutura orgânica, produzida de maneira sintética, sendo composta pelos elementos carbono, hidrogênio e compostos não metálicos. Sua morfologia se diferencia durante seu processo de polimerização sendo classificada em quatro diferentes fases: fibrosa, borrachóide, resinosa e rígida (12).

Em meados do ano de 1930 as resinas à base de polimetilmetacrilato tornaram-se uma alternativa para confecção de dispositivos odontológicos (13). Esse material foi progredindo e seus atributos como a biocompatibilidade, as propriedades térmicas adequadas, a estabilidade dimensional, o bom potencial de polimento, a estética agradável e o fácil manuseio o levaram a ganhar mais destaque na odontologia. Dentre suas aplicações na odontologia enfatiza-se a confecção de próteses bucais e faciais, placas para disfunções temporomandibulares, moldeiras individuais, próteses provisórias imediatas, placas obturadoras de palato, coroas provisórias, dentes artificiais, acrilização de aparelhos ortodônticos, confecção de próteses internas, próteses oculares, entre outros (1,14,15).

Na odontologia, essencialmente existem dois tipos de resinas acrílicas de acordo com o processo de polimerização: as resinas acrílicas autoativadas e as resinas acrílicas termoativas. As resinas autoativadas têm sua polimerização ativada graças a um agente, normalmente uma amina terciária, e a resina termopolimerizada tem como ativador o calor. Esses ativadores, em suas respectivas resinas, quebram as moléculas de peróxido de benzoíla formando radicais livres se ligando ao monômero e essa reação se propaga até chegar à fase de terminação (15).

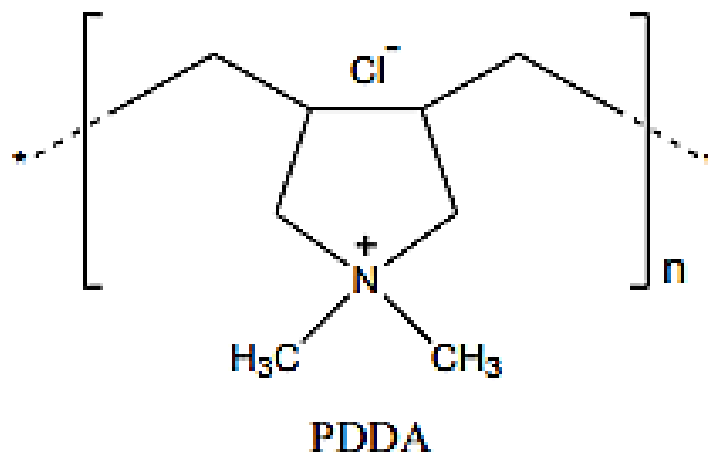
Esse material, apesar de ser tão difundido na odontologia, está suscetível a modificação de temperatura, diferentes tensões e também presença de líquidos oriundos das mais diversas origens. Por esse material ser um compósito, esses fatores ocasionam diversos tipos de degradação do material (1,16,17,18).

Atualmente, as resinas acrílicas vêm sendo aprimoradas em suas características alcançando melhores propriedades e, conseqüentemente, uma melhor aplicabilidade durante seu uso (19,20).

2.2 POLI(CLORETO DE DIALILDIMETILAMÔNIO)

O PDADMAC é um polímero hidrossolúvel bastante usado em purificação de águas (Figura 2.1). Graças às suas moléculas de sais de amônio quaternário esse composto apresenta ação biocida (21,22).

Figura 2.1 - Estrutura química do policloreto de dialildimetilamônio



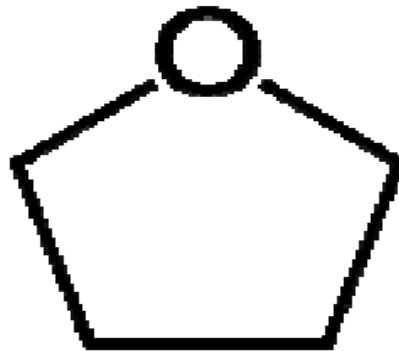
Fonte: Turrer (2004, p. 39) (23)

Existem diferentes mecanismos de ação desse biocida citados na literatura, porém o mecanismo mais aceito é a interação eletrostática entre a carga positiva do cátion amônio com as cargas negativas da membrana celular causando assim ruptura da membrana celular (23,24,25,26).

2.3 TETRAHIDROFURANO

O THF (Figura 2.2) é um composto orgânico heterocíclico volátil e graças ao seu hidrogênio dissociável é classificado como um solvente aprótico, capaz de dissolver componentes polares e apolares (27).

Figura 2.2 - Estrutura química do tetrahidrofurano



Fonte: Fontes (2009, p 15) (28)

2.4 FUNGOS

Os fungos foram considerados durante anos como seres vivos do reino *Plantae*, só a partir de 1969 foram classificados em um reino a parte, denominado *Fungi*. Essa mudança na classificação foi realizada graças a algumas características como não sintetizam clorofila, não armazenam amido, não fazem o processo de fotossíntese e sua grande maioria não apresenta celulose em sua parede celular (29).

Esses seres vivos são eucariontes e tem a capacidade de se adaptar em diversos locais (29,30). Dentre eles destacaremos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

2.4.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é formado por cerca de 200 espécies e podem ser encontradas nas mais diversas partes do corpo humano (31). Shepherd em 1990 (32) já destacava oito espécies de *Candida* graças a sua importância médica e odontológica, sendo elas:

- *Candida albicans*
- *Candida tropicalis*
- *Candida glabrata*
- *Candida parapsilosis*
- *Candida guilliermondii*
- *Candida krusei*
- *Candida pseudotropicalis*
- *Candida stellatoidea*

Em 1995, com a inserção da biologia molecular, novas espécies de *Candida* foram identificadas e dentre elas a *Candida dubliniensis* (33).

2.4.1.1 *Candida albicans*

Entre as espécies que constituem esse gênero, a *Candida albicans* (Figura 2.3) tem um papel de destaque graças a sua elevada prevalência em condições de normalidade e/ou de doença. É um fungo dimórfico, que se apresenta nas formas leveduriformes (blastoconídios) e filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras). Além disso, sob condições de crescimento subótimas, nesse fungo pode ocorrer a formação de clamidósporos. Dessa forma, essa espécie tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos. Seu crescimento ocorre na temperatura de 20°- 40° Celsius, em pH 2 – 8 e tem capacidade de desenvolver micoses cutâneas e sistêmicas (34).

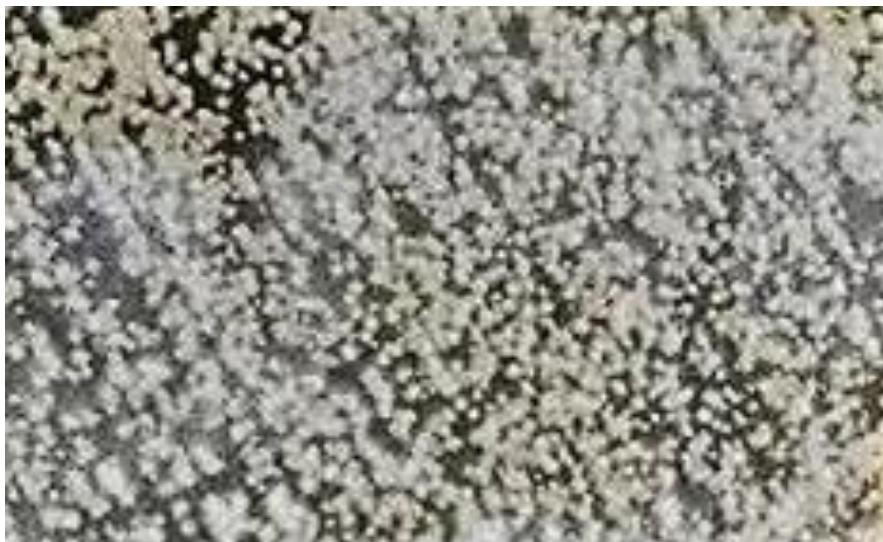
Esse fungo pode apresentar características de colônia lisa, cremosa (Figura 2.4), mucosa ou enrugada com coloração branca a amarelada, ou mesmo aspecto amarronzado em menor proporção (35).

Figura 2.3 - Microscopia de *Candida albicans* ao exame direto



Fonte: O autor.

Figura 2.4 - Estrutura macroscópica da *Candida albicans*



Fonte: O autor.

Esse fungo é um patógeno oportunista rotineiramente isolado das superfícies das mais diversas mucosas de indivíduos saudáveis. Porém, quando essa relação saudável é rompida há o desenvolvimento de uma infecção denominada candidíase. Essa infecção fúngica pode se apresentar de diversas formas, desde lesões superficiais até infecções disseminadas (36,37)

Em mucosa oral essa infecção é dividida de acordo com a sua apresentação clínica como candidíase pseudomembranosa, candidíase eritematosa, candidíase crônica hiperplásica e candidíase mucocutânea (38)

2.4.2 *Aspergillus niger*

O *Aspergillus niger* foi descrito por Van Tieghen em 1867 e caracterizando-se por desenvolver colônias em menos de sete dias (Figura 2.5), apresentando no início aspecto de camurça branca ou amarelada, mas que rapidamente fica coberta por uma densa camada de cabeças conidiais negras (Figura 2.6) (39).



Fonte: O autor.

Figura 2.6 - *Aspergillus niger* cultivado em ágar Sabouraud



Fonte: O autor.

Esse fungo é um agente etiológico secundário de otites bacterianas e é causa comum de doenças pulmonares em pacientes imunossuprimidos. O achado de

cristais de oxalato de cálcio em amostras microscópicas é clássico para infecção por *Aspergillus niger* e pode ser útil para fazer um diagnóstico, mesmo na ausência de conídios (40).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 GERAL

Verificar a eficiência antifúngica do biocida policloreto de dialildimetilamônio incluído em resina acrílica autopolimerizável e termopolimerizável.

3.2 ESPECÍFICAS

3.2.1 Realizar testes antifúngicos frente às cepas padrões de ATCC estabelecido oriundas da micoteca do laboratório do grupo de pesquisa de leveduras patogênicas do CNPq.

3.2.2 Identificar 348 cepas oriundas da mucosa oral de pacientes sem comprometimentos sistêmicos mantidas em micoteca no laboratório do grupo de pesquisa de leveduras patogênicas do CNPq

3.2.3 Realizar testes para estabelecimento de fator de virulência nessas cepas e submeter cepas virulentas a testes antifúngicos com as resinas contendo biocida.

3.2.4 Realizar testes de citotoxicidade dos materiais frente a células da papila dentária.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Na referida pesquisa foram utilizados os materiais:

- Resina à base de polimetilmetacrilato autopolimerizável (CAAR) e termopolimerizável (TAAR) da marca Clássico®.
- Policloreto de dialildimetilamônio (PDADMAC) da SIGMA®.
- Tetrahidrofurano (THF) da Synth®.

Desses materiais foram confeccionados os corpos de prova de acordo com o protocolo de Dos Santos (2016) (41).

Os fungos utilizados foram:

- Fungos *Candida albicans* da American Type Culture Collection (ATCC) 10231 e *Aspergillus niger* de ATCC 16404.
- Fungos coletados da cavidade oral e micotecados no laboratório de leveduras patogênicas do laboratório CONTROLBIO.

Os corpos de prova foram colocados frente aos fungos ATCC *Candida albicans* e *Aspergillus niger* de acordo com os protocolos G21-15 e o E2149-13 e frente as cepas de *Candida albicans* que estavam estocadas no laboratório de leveduras patogênicas do CNPq.

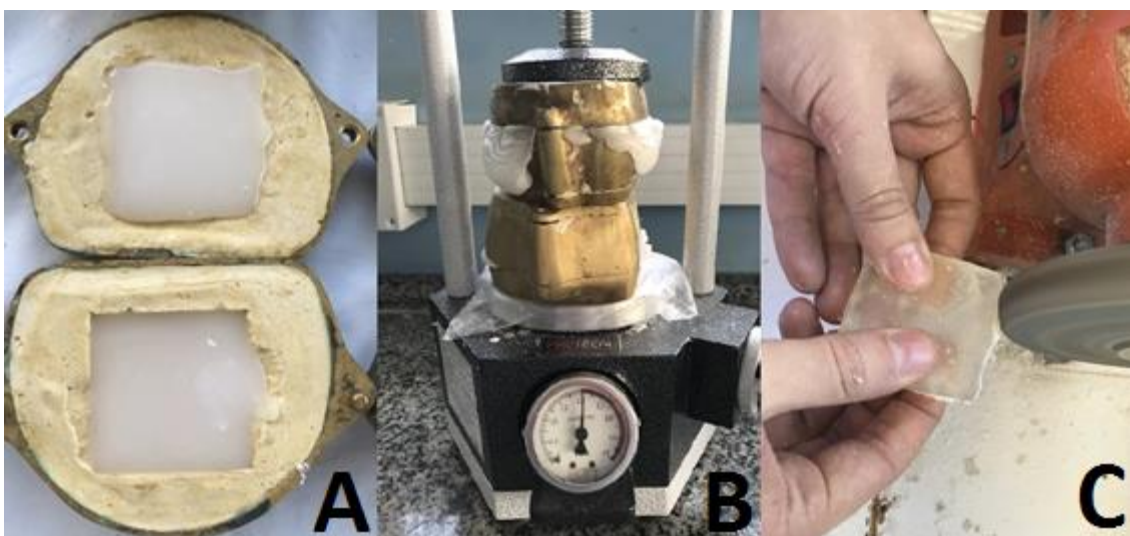
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Confeção dos corpos de prova

Dos Santos em 2016 (41) realizou a inclusão do biocida policloreto de dialildimetilamônio durante manipulação das resinas acrílicas e obteve resultados satisfatórios e evidentes da sua inclusão. Seguindo o protocolo então criado pelo mesmo, foi utilizado o PDADMAC da Sigma® diluído no solvente tetrahidrofurano da Synth® até chegar à concentração 4% em peso (wt) por 10 milímetros (ml). Essa solução foi aplicada durante a manipulação das resinas acrílicas da marca Clássico®, prensadas em muflas nº 6, pré-estabelecidas, com duas toneladas. Vale ressaltar que foram respeitadas todas as propriedades do fabricante.

Para as resinas acrílicas autopolimerizáveis, foi esperado então o tempo de polimerização para sua desinclusão obtendo-se assim os corpos de prova (CP) (Figura 4.1). Os formatos dos corpos de prova variaram frente ao teste proposto.

Figura 4.1 - Confeção dos CP de conformação quadrada. A: Adaptação da resina acrílica com o biocida na mufla. B: Prensagem em prensa hidráulica com duas toneladas. C: Acabamento dos CP pós desinclusão dos mesmos



Para as resinas termopolimerizáveis foram realizados ciclos longos a baixa temperatura onde foram colocadas as mufas em água fria, numa polimerizadora com termostato. A regulação da polimerizadora procedeu-se da seguinte maneira:

- Aqueceu-se a água à temperatura de 60°C mantendo-se durante 3 horas;
- Decorridas as três horas, elevou-se a temperatura para 70°C e mantendo-os por mais 9 horas;
- Logo após esse tempo, desligou-se a polimerizadora e aguardou-se o resfriamento da água para desinclusão e posterior acabamento dos CP.

A partir disso foram formados quatro grupos de CP:

1. CAAR – Resina acrílica quimicamente ativada sem aditivo do biocida.
2. CAAR+ - Resina acrílica quimicamente ativada com aditivo do biocida.
3. TAAR – Resina acrílica termicamente ativada sem aditivo do biocida.
4. TAAR+ - Resina acrílica termicamente ativada com aditivo do biocida.

4.2.2 Esterilização com radiação Gama

A radioesterilização é um método bastante difundido de esterilização e dispositivos médicos, produtos farmacêuticos e tecidos biológicos têm usufruído desse processo. Sua dose deve ser em média de 25 quiloGray (kGy) (42, 43, 44).

Visando isso, os corpos de prova foram submetidos à radioesterilização utilizando radiação gama na dose de 25 kGy. Todo esse processo foi realizado no Instituto de Pesquisas em Energias Nucleares da Universidade de São Paulo sob supervisão da Engenheira Elizabeth Sebastiana Ribeiro Somessari.

4.2.3 Testes antifúngicos

4.2.3.1 Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi

Foram realizados testes a partir da norma da American Society for Testing and Materials (ASTM) G21-15 (45) nomeada de “Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi”. O procedimento descrito nesta prática consiste na seleção de espécimes adequados para a determinação de propriedades pertinentes, onde no presente projeto constituiu a propriedade antifúngica. A norma se baseia na inoculação dos microrganismos adequados em placa de petri, exposição do inoculado, classificação para crescimento visual.

A partir disso, foi realizado o processo frente aos corpos de prova confeccionados onde o seu resultado variava em códigos de 0 à 4. Foram avaliados de acordo com o fungo inoculado em 7, 14 e 21 dias. Esse teste foi realizado em triplicata.

4.2.3.2 Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions

Foram realizados testes a partir da norma da ASTM E2149-13 (46) nomeada de “Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions”. Essa norma se baseia na possibilidade de uma atividade antimicrobiana de um agente antimicrobiano ligado a um substrato, não lixiviante, onde haverá o contato direto do microrganismo com o agente químico ativo. A partir disso, este teste determina a atividade antimicrobiana da superfície do material submetido a suspensão bacteriana ou fúngica concentrada durante um tempo de contato de uma hora.

A partir disso, a suspensão foi diluída em série antes e depois do contato e cultivada. O número de organismos viáveis, a partir da suspensão foi determinado e a percentagem de redução foi calculada comparando as recuperações a partir do controle apropriado. Esse teste foi realizado em triplicata.

4.2.4 Identificação das leveduras

348 cepas de leveduras foram armazenadas no laboratório de leveduras patogênicas do CNPq após o processo de liofilização e congelamento a -20°C , para preservação dessas amostras. Essas cepas foram utilizadas para provas de identificação. O repique foi realizado e foram deixadas 24 horas para seu crescimento em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), incubadas a 25°C .

4.2.4.1 Identificação das leveduras através dos métodos tradicionais

As leveduras isoladas foram identificadas a partir dos seus aspectos macro e micromorfológicos, produção de tubos germinativos, pesquisa de clamidoconídios, e pela produção de enzima urease (29,47).

4.2.4.1.1 *Caracterização macromorfológica*

Os aspectos macromorfológicos das colônias isoladas foram analisados com relação a sua coloração, formato das bordas e textura.

4.2.4.1.2 *Caracterização micromorfológica*

Para a caracterização micromorfológica, foram realizados os métodos de coloração de GRAM, teste de tubo germinativo e pesquisa de clamidoconídio.

4.2.4.1.3 *Coloração de GRAM*

Os esfregaços das amostras coletadas foram submetidos à coloração pelo método de GRAM com visualização microscópica na objetiva de 100x em óleo de imersão. As características microscópicas pesquisadas foram quanto à verificação da presença de célula leveduriforme, tipo de brotamento e presença ou não de micélio.

4.2.4.1.4 *Prova do tubo germinativo*

Este teste foi realizado com a finalidade de triar *C. albicans* e *C. dubliniensis* das demais leveduras. Para essa pesquisa, as amostras de leveduras foram cultivadas em ASD a 37°C por 48h. Uma alçada de cada amostra foi inoculada em tubos contendo 0,5 mL de soro fetal bovino (Cultilab®, Brasil), na escala 3 de Mc Farland. Esse é um procedimento rápido para a pesquisa de tubo germinativo.

A leitura foi realizada a partir de uma alçada do conteúdo líquido acima descrito, colocando em lâmina de microscopia, sendo coberto por lamínula. Após um período de 1 a 3 horas, em estufa a 35°C, foi observado ou não a formação dos tubos germinativos, com visualização em microscópico óptico na lente objetiva de 40X. Foi considerada prova positiva nos casos em que ocorreu a formação de filamento fino e cilíndrico originado do blastoconídeo da levedura, como uma extensão, sem constrição.

4.2.4.1.5 *Microcultivo em ágar fubá*

Para a observação da formação dos clamidoconídios, as amostras isoladas foram repicadas em ASD e incubadas a 25°C por 24h. As colônias jovens foram subcultivadas em placas com meio de cultura ágar fubá acrescido com Tween 80,

coberto por uma lamínula estéril, e incubado a 25°C, por até 96 horas. Foram pesquisadas em microscopia óptica, em objetivas de 10 e 40X, estruturas redondas de parede espessa, isoladas ou em cachos, na extremidade das pseudohifas. Os clamidoconídios terminais e intercalares são características de *C. albicans*. Os que estão dispostos em formato de cacho ou "triplets" são característicos de *C. dubliniensis* (48).

4.2.4.2 Métodos bioquímicos

Foram realizados os testes zimograma e auxonograma para de acordo com os métodos preconizados por Kurtzman, Fell & Boekhout em 2011.

4.2.4.3. Métodos moleculares para verificar a presença de *Candida dubliniensis*.

Para a realização dos ensaios de identificação das leveduras do gênero *Candida* para as espécies *dubliniensis* foram utilizadas amostras padrões ATCC como controle do teste, sob a identificação de ATCC 64548 (*C. albicans*) e ATCC 777 (*C. dubliniensis*).

Os métodos moleculares fornecem uma identificação precisa e rápida, sendo também uma ferramenta importante na epidemiologia promovendo a tipagem molecular (49,50). Na presente pesquisa, o DNA foi retirado, quantificado e amplificado seguindo o protocolo de Chavasco em 2006 (51). Dois pares de primers foram utilizados: um para *C. dubliniensis* (sentido: CDU2 - 5'AGT TAC TCT TTC GGG GGT GGC CT 3'; anti-sentido: NL4CAL - 5' AAG ATC ATT ATG CCA ACA TAG TAG GTA AA 3') e outro para *C. albicans* (sentido: CAL5 - 5' TGT TGC TCT CTCGGG GGC GGC CG 3'; anti-sentido: NL4CAL - 5' AAG ATC ATTATG CCA ACA TAG TAG GTA AA 3'). O DNA já amplificado foi submetido à eletroforese em placa horizontal (Horizon 58-Life Technologies) com gel de agarose a 1% em tampão TBE a 100V por 35 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (Sigma)

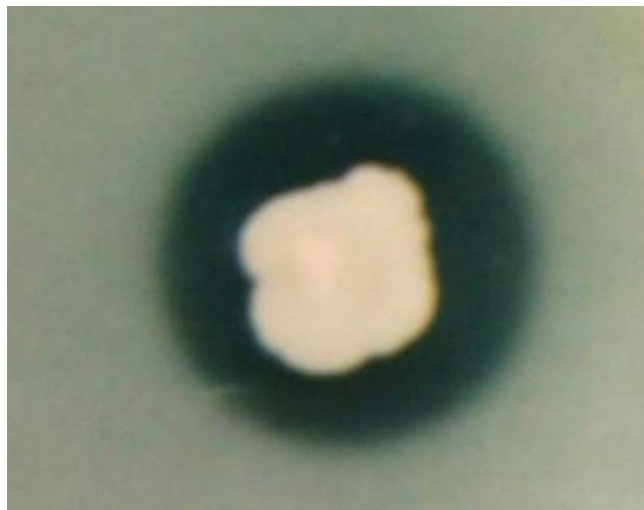
e as bandas de DNA foram observadas em um transiluminador UV equipado com uma câmera de vídeo ligada a um computador (Multiimage LightCabinet da Alpha Innotech Corporation) e fotografado.

4.2.5 Fator de virulência - Protease

Para realizar a pesquisa sobre o fator de virulência, produção de protease, foi utilizada a técnica proposta por Ruchel et al e Cardoso et al (52,53). Em cada placa de Petri contendo o meio com albumina bovina fração V foi semeado apenas uma cepa. A semeadura foi feita na parte central da superfície do meio. As placas foram incubadas a 32°C por até 15 dias.

A produção de protease pela cepa foi verificada pela presença de um halo de degradação ao redor da colônia (Figura 4.2). A atividade proteolítica, denominada Pz é expressa por meio do cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e a zona de degradação (dcp) onde $Pz \geq 1,0$ é igual a ausência de atividade enzimática sendo classificado como índice 1; $Pz \geq 0,64 < 1,0$ é igual a atividade enzimática positiva sendo classificada como índice 2; $Pz < 0,6$ é igual a atividade enzimática fortemente positiva sendo classificada como índice 3. Esse teste foi realizado em triplicata.

Figura 4.2 - Área de degradação em albumina bovina frente à reação de protease



Fonte: O autor.

4.2.6 Teste de citotoxicidade

4.2.6.1 Cultura de células

Células-tronco de polpa dentária (DPSCs) foram gentilmente doadas pelo Banco de Células da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para este estudo. As células foram descongeladas e cultivadas em meio de cultura clonogênico composto por meio mínimo de Eagle modificado por alfa (α -MEM) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino mesenquimatoso (MSC- FBS, Gibco); Penicilina 100 U / ml (Invitrogen / Gibco); 100/ml de estreptomicina (Invitrogen / Gibco, Grand Island, NY; EUA); Ácido ascórbico 0,1 mM (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA) e L-glutamina 2 mM (Gibco). As células foram mantidas numa incubadora a 37 ° com uma atmosfera húmida de 5% de CO₂ e 95% de ar.

4.2.6.2 Meio Condicionada e Grupos Experimentais

O meio de cultura foi colocado em contato com os blocos de resina polimerizada por 24 h em incubadora de CO₂ a 37 ° C. O meio condicionado contém todas as substâncias lixiviadas pelos materiais (54). Fragmentos dos blocos de resina polimerizada foram colocados no fundo de tubos de centrífuga de 50 mL, os quais foram preenchidos com meio de cultura (0,2 g de material por 1 mL de meio clonogênico) (55). Ao final do período de incubação, os meios condicionados foram esterilizados em filtro de 0,22 μ m e aplicados em cinco concentrações (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) às células, de acordo com os grupos experimentais. O meio clonogênico condicionado com 0% das substâncias serviu como controle positivo.

Os grupos experimentais foram: Controle Positivo (células mantidas em meio clonogênico sem substâncias - concentração de 0%), CAAR (células mantidas em meio clonogênico condicionado pelo CAAR), CAAR + (células mantidas em meio

clonogênico condicionado pelo CAAR com o biocida), TAAR (células mantidas em meio clonogênico condicionado por TAAR) e TAAR + (células mantidas em meio clonogênico condicionado por TAAR com o biocida).

4.2.6.3 Ensaio de citotoxicidade

Para medir a citotoxicidade dos blocos de resina polimerizada, o ensaio de redução de MTT foi aplicado como descrito noutro local (Ferreira et al., 2018). Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços (1x10³ células / poço) em meio clonogênico (num mínimo de 5 poços por grupo por concentração). Quarenta e oito horas depois, o meio de cultura foi substituído pelo meio condicionado de acordo com os grupos experimentais em 5 concentrações diferentes. Após vinte e quatro horas em contato com o meio condicionado, as células foram submetidas ao ensaio de redução de MTT, que envolve a conversão do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio solúvel em água (MTT) a um formazan insolúvel. O formazan é então solubilizado e a concentração é determinada pela densidade óptica a 570 nm. Os dados de absorbância foram usados para traçar as curvas de viabilidade celular. As densidades ópticas de todos os grupos obtidos a partir do ensaio de redução de MTT foram transformadas em porcentagens de viabilidade celular. A densidade óptica média das culturas de controle positivo foi considerada como 100% de viabilidade celular

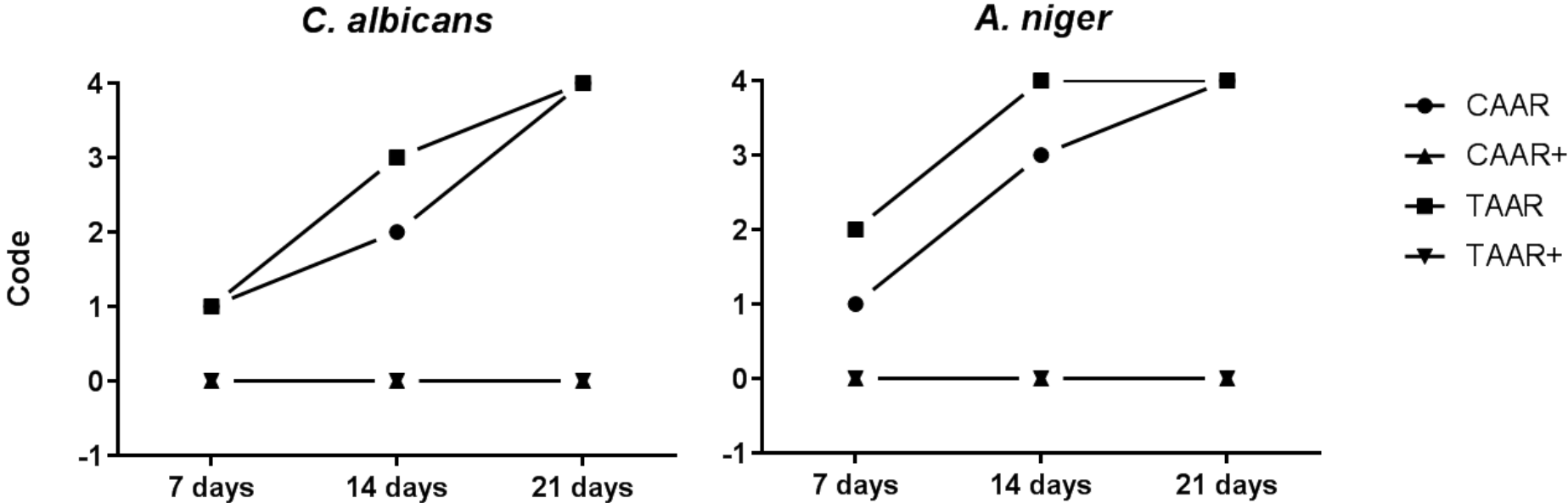
5 RESULTADOS

5.1 TESTES ANTIFÚNGICOS

5.1.1 G21-15

O teste G21-15 foi realizado e frente *Candida albicans* foi observado que os CP de CAAR+ e TAAR+ mantiveram o código 0 nos três tempos de avaliação, obtendo uma eficácia significativa. Já os CP de CAAR e TAAR obtiveram um aumento gradual do código, não sendo assim capazes de impedir o crescimento fúngico. Os resultados frente ao *Aspergillus niger* foram semelhantes (Gráfico 5.1).

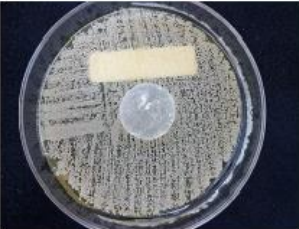



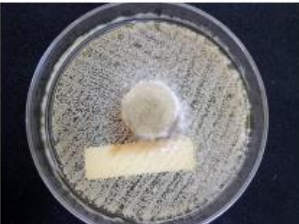

Gráficos 5.1 - Avaliação do crescimento fúngico pelo protocolo G21-15 sendo o gráfico da esquerda frente ao fungo *C. albicans* e o da direita frente ao fungo *A. niger*



Fonte: O autor..

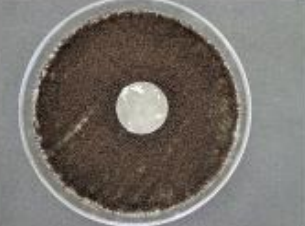





Os resultados foram registrados também através de fotografia pela câmera Nikon D610 Full HD conforme a tabela 5.1 e tabela 5.2.

Tabela 5.1 - Resultados dos corpos de prova frente ao *C. albicans* evidenciados através de fotografias. Amostra 1: CAAR+. Amostra 2: TAAR+. 1º coluna contendo fotos: Vista superior. 2º Coluna contendo fotos: vista inferior

Leitura com 28 dias	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
Amostra 01		
Amostra 02		
Controle		

Fonte: O autor.

Tabela 5.2 - Resultados dos corpos de prova frente ao *A. niger* evidenciados através de fotografias. Amostra 1: CAAR+. Amostra 2: TAAR+. 1º coluna contendo fotos: Vista superior. 2º Coluna contendo fotos: vista inferior

Leitura com 28 dias	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	
Amostra 01		
Amostra 02		
Controle		

Fonte: O autor.

5.1.2 E 2149-13

Foi realizado o teste 2149-13 onde foi observado que a CAAR e TAAR não foram capazes de reduzir o crescimento fúngico. Já a CAAR+ e TAAR+ obtiveram uma redução de cerca de 99,99% frente às cepas de *Candida albicans* e de 0% frente às cepas de *Aspergillus niger* (Tabela 5.3), em ambas as resinas.

Tabela 5.3 - Redução fúngica frente aos grupos testados CAAR, CAAR+, TAAR e TAAR+

	<i>Candida albicans</i>					<i>Aspergillus niger</i>				
	Média inicial	Média final	Redução logarítmica	% de redução	Valor de significância (p<0.05)	Média inicial	Média final	Redução logarítmica	% de redução	Valor de significância (p<0.05)
CAAR	2.2x10 ⁵	2.5x10 ⁵	-0.06	-	0,1217	1.5x10 ⁵	1.8x10 ⁵	-0.08	-	0,1217
CAAR+	2.2x10 ⁵	1.2x10 ⁵	4.26	99.9%	<0,0001*	1.5x10 ⁵	1.6x10 ⁵	-0.03	-	0,4778
TAAR	2.2x10 ⁵	2.4x10 ⁵	-0.04	-	0,2254	1.5x10 ⁵	1.9x10 ⁵	-0.10	-	0,0742
TAAR+	2.2x10 ⁵	1.0x10 ⁵	4.34	99.9%	<0,0001*	1.5x10 ⁵	1.55x10 ⁵	-0.01	-	0,3206

*Redução estatisticamente significante.

Fonte: O autor.

5.2 IDENTIFICAÇÃO

Foram identificadas 348 amostras que estavam micotecadas de pacientes sem comprometimentos sistêmicos. A faixa etária das pessoas coletadas variava de 2 a 40 anos, com média de idade de 23 anos. A tabela 5.4 evidencia a distribuição das espécies de *Candida*.

Tabela 5.4 - Número de cepas de *Candida* identificadas de acordo com a sua espécie

Prevalência das espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> em pacientes sem comprometimento sistêmico - n(%)	
<i>C. albicans</i>	233 (66,9)
<i>C. tropicalis</i>	31 (8,9)
<i>C. parapsilosis</i>	30 (8,6)
<i>C. dubliniensis</i>	21 (6,0)
<i>C. glabrata</i>	17 (4,9)
<i>C. guilliermondii</i>	11 (3,2)
<i>C. krusei</i>	4 (1,1)
<i>C. lusitaniae</i>	1 (0,3)
Total	348 (100)

Fonte: O autor.

5.3 PROTEASE

Dessas cepas foram selecionadas as cepas de *Candida albicans* e foram realizados os testes para averiguar a virulência. Das 233 cepas, 124 obtiveram código 1, 57 obtiveram código 2 e 52 com código 3.

Algumas dessas cepas, precisamente 8, foram selecionadas e submetidas aos testes antifúngicos. Das 8 cepas onde 3 eram do índice 1, 2 do índice 2 e 3 do índice 3.

5.4 TESTE ANTIFÚNGICO FRENTE ÀS CEPAS IDENTIFICADAS

Foram colocadas frente aos corpos de prova 8 cepas selecionadas de *Candida albicans*, como apresentado na tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Correlação entre as cepas, seu fator de virulência, os resultados nos testes antifúngicos frente aos fungos investigados e as cepas controle

Amostra	Código de acordo com a Protease	Código do teste fungistático frente a <i>C. albicans</i> durante o período de 28 dias	Cepas controle
1	Código 1	Código 0	Positivo
2	Código 1	Código 0	Positivo
3	Código 1	Código 0	Positivo
4	Código 2	Código 0	Positivo
5	Código 2	Código 0	Positivo
6	Código 3	Código 0	Positivo
7	Código 3	Código 0	Positivo
8	Código 3	Código 0	Positivo

Fonte: O autor.

Os resultados foram registrados também através de fotografia pela câmera Nikon D610 Full HD conforme a tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Resultados dos corpos de prova frente *C. albicans* oriunda de mucosas jugal que estavam micotecadas no laboratório do grupo de pesquisa de leveduras patogênicas no CNPq evidenciando os resultados através de fotografias. Linha superior: TAAR+. Linha inferior: CAAR+



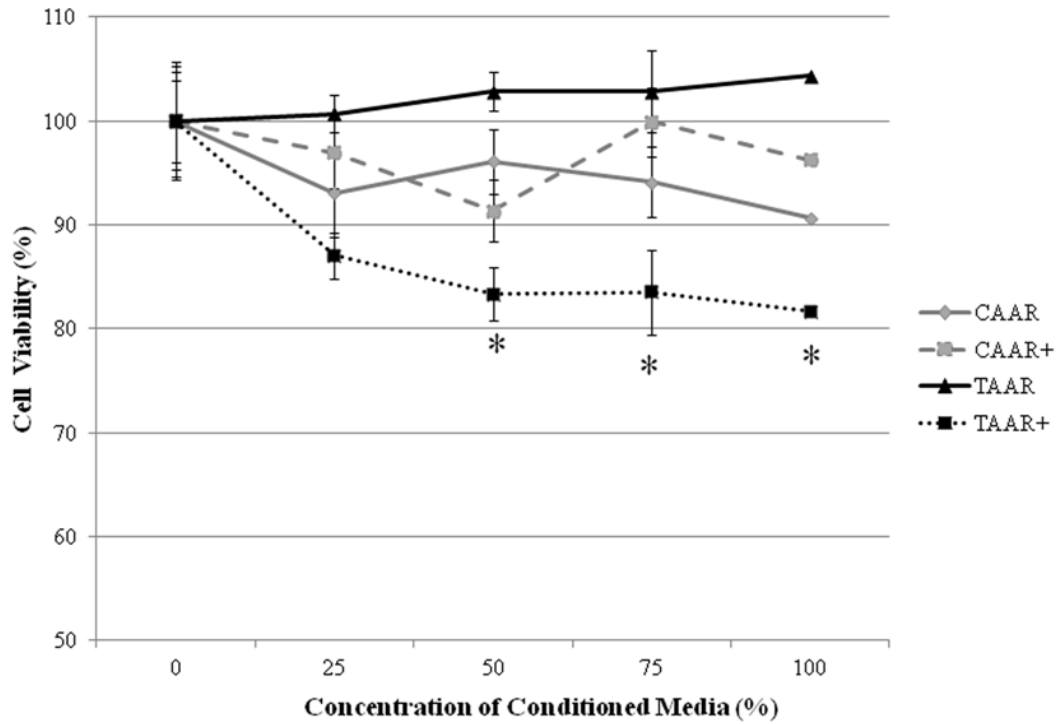
Fonte: O autor.

5.5 CITOTOXICIDADE

O gráfico 5.2 ilustra graficamente os resultados do ensaio de citotoxicidade. As porcentagens médias de viabilidade celular de todos os grupos variaram de 81,66% a 100%. As porcentagens de viabilidade celular de todos os grupos tratados com meios condicionados pelos diferentes materiais nas 4 concentrações utilizadas (25%, 50%, 75% e 100%) foram semelhantes quando comparadas com as do grupo controle positivo (células mantidas em meio clonogênico - 0%).

Culturas tratadas com as diferentes concentrações do mesmo meio condicionado apresentaram porcentagens de viabilidade celular semelhantes para todas as substâncias testadas. Diferenças estatísticas foram observadas apenas quando comparados os diferentes meios condicionados aplicados na mesma concentração. O grupo TAAR+ apresentou percentuais significativamente menores de viabilidade celular quando comparado ao grupo TAAR ($p < 0,05$) em concentrações superiores a 50%.

Gráfico 5.2 - Representação gráfica da viabilidade celular média (%) em função das concentrações de meios condicionados (%) para os diferentes grupos experimentais. As barras indicam erro padrão da média; * mostra diferença estatisticamente significativa entre TAAR e TAAR+ na mesma concentração ($p < 0.05$)



Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Polímeros com potencial antimicrobiano começaram a ser conhecidos quando Cornell e Dunraruma em 1965 (56) descreveram em seus trabalhos compostos preparados a partir de 2-methacryloxytroponones que possuíam eficácia antibacteriana. Desde então, o número de polímeros antimicrobianos aprovados pela Agência Federal Americana Food and Drug Administration (FDA) tem aumentado constantemente graças às novas necessidades e resistência antimicrobiana aos compostos já conhecidos (57).

Existem duas maneiras de se estabelecer um sistema polimérico com propriedades antimicrobianas: (1) interação física (ancoragem na estrutura do material); ou (2) quimicamente (ligando as cadeias de compostos químicos). Embora acreditemos que a interação gerada em nosso material é física, há necessidade de mais estudos para essa afirmação. Em relação à inclusão do PDADMAC, observamos que essa etapa foi determinante para os potenciais antibacterianos e antifúngicos. Neste trabalho, propomos a adição simples de compostos antimicrobianos às resinas acrílicas como alternativa a processos como a polimerização do radical de transferência de átomos (58), polimerização por enxerto de superfície de polímero e papel (59) e até mesmo em radicais metálicos (60).

O PDADMAC foi previamente testado pelo nosso grupo de pesquisa em outros materiais e com diferentes métodos de inclusão (61,62,63), sem sucesso, uma vez que a metodologia de inclusão utilizada não foi capaz de gerar com incorporação homogênea do biocida nos materiais testados. No presente estudo com a incorporação bem sucedida de PDADMAC ao material acrílico, as atividades antibacteriana, antifúngica e a biocompatibilidade apontam expectativas promissoras para a confecção de dispositivos à base de resinas acrílicas com propriedades antimicrobianas.

Os resultados dos testes antifúngicos demonstraram que as estruturas leveduriformes são sensíveis aos grupos CAAR+ e TAAR+, porém as estruturas filamentosas foram sensíveis apenas ao nível fungistático frente aos grupos CAAR+ e TAAR+, levando os autores a acreditar na afinidade desses

composto aos fungos leveduriformes. Esse dado corrobora com Sanches et al. em 2016 (64) onde os autores sugerem que o PDADMAC tem potencial de alcançar sítios como a membrana celular e a parede celular dessas estruturas.

Mesmo sem demonstrar potencial fungicida para os fungos filamentosos, esses resultados são extremamente relevantes para a área odontológica, pois a grande maioria das infecções que acometem a região de cabeça e pescoço é causada por estruturas leveduriformes (38).

Além disso, a questão da resistência bacteriana e fúngica devido à expressão de alguns genes de resistência chama a atenção para a necessidade do desenvolvimento de pesquisas com cepas de leveduras em ambiente clínico, uma vez que é sabido que fatores de virulência podem se modificar ao longo do tempo em culturas mantidas em sets laboratoriais quando há necessidade de repiques sucessivos. Pesquisas atuais mostram, por exemplo, que bactérias de amostras clínicas recentes apresentam o gene *qac* e que fungos de amostras clínicas recentes possuem a expressão do gene *ERG11*. Sua detecção está associada a uma concentração antibacteriana e antifúngica mínima maior (65,66). O gene *ERG11*, conhecido como o gene de resistência para biocidas e anti-sépticos, já foi descrito em diversos locais (67). Portanto, em um trabalho futuro, cepas clínicas contendo esse genes devem ser testadas para verificar os potenciais fungicida e fungistático desses materiais frente a essa característica de resistência.

Com relação às cepas de *Candida* micotecadas devemos lembrar que a colonização por *Candida* é rotineira nos seres humanos e que várias espécies de *Candida* fazem parte da microbiota oral. (68). No presente trabalho, devemos salientar o número representativo de isolados de mucosa oral identificados de forma criteriosa o fato que mesmo em literatura mundial é pouco frequente, conferindo assim maior confiabilidade aos resultados aqui descritos.

O presente autor chama a atenção para o número de estudos que têm sido observados na literatura identificando cepas de *C. não-albicans* sem métodos corretos de identificação convencional e/ou molecular, que são indispensáveis para a precisão e confiabilidade do processo, como demonstrado por Livério et al. em 2017 (69) e Jafari et al. em 2017 (70). Esses resultados, portanto, podem construir falsos positivos e falsos negativos devido

à falta de especificidade. Uma atenção especial deve ser dada à correta identificação das espécies de *Candida* presentes.

O teste de viabilidade celular através da redução do MTT mostrou que a resina TAAR + obteve os piores resultados, apresentando maior citotoxicidade quando comparada ao grupo TAAR. Talvez isso seja devido a um excesso de PDADMAC na superfície, como indicado pelas medidas do ângulo de contato, ou pela possível formação de subprodutos durante a ativação térmica. Por outro lado, os testes relacionados à resina CAAR+ mostram resultados mais favoráveis, uma vez que sua citotoxicidade foi semelhante à dos grupos controle.

Por fim, foi observado que os testes na resina CAAR+, em geral, demonstraram resultados mais favoráveis em sua citotoxicidade, potencial antibacteriano e potencial antifúngico. No entanto, o grupo TAAR + não deve ser descartado, uma vez que cumpriu todas as condições necessárias para um potencial material antifúngico.

Há certamente um grande número de variáveis ainda a serem testadas antes de uma aplicação clínica mais abrangente do material. Questões como a influência da adição do biocida nas propriedades mecânicas e estéticas das resinas; longevidade ou meia-vida da ação fungicida do biocida incorporado à resina; comportamento do material no meio bucal diante da umidade presente e da complexidade da microflora residente; constituem aspectos que ainda demandam desenvolvimento de pesquisas adicionais nas esferas mecânica, físico-química e biológica.

A identificação e realização de testes com amostras da micoteca residente no laboratório do CNPq buscou demonstrar a efetividade da incorporação do biocida diante de diferentes cepas de *Candida* e distintos graus de virulência, no entanto sabe-se que o ambiente in vivo pode produzir o biofilme oral. Mais pesquisas envolvendo esse tipo de constituinte devem ser realizadas futuramente.

A incorporação do PDADMAC nas resinas auto e termopolimerizáveis parece promissora na Odontologia, conferindo propriedade vantajosa a esse material já de uso consagrado.

7 CONCLUSÕES

- A incorporação de PDADMAC nas resinas acrílicas foi determinante para alcançar as propriedades antifúngicas desejadas.
- Entre os grupos de resinas que apresentaram adição de biocida, os grupos CAAR+ e TAAR+ obtiveram eficácia e percentual antifúngico similar.
- Foram identificadas 348 cepas de fungos do gênero *Candida* onde a grande maioria foi identificada como a espécie *albicans*, seguida das espécies *tropicalis*, *parapsilosis*, *dublinskiensis*, *glabrata*, *guilliermondii*, *krusei* e *lusitaniae*.
- Independente do fator de virulência das cepas de *Candida* ambas as resinas aditivadas tem eficácia antifúngica.
- O CAAR e o TAAR, independentemente da adição ou não do PDADMAC, são materiais biocompatíveis após a polimerização.

REFERÊNCIAS¹

1. Rezende JRV. Fundamentos da prótese buco-maxilo-facial. São Paulo: Sarvier; 1997.
2. Carvalho CM, Dias RB, Câmara BSM, André M. Reabilitação protética Craniomaxilofacial. São Paulo: Editora Santos; 2010.
3. Cardoso SMO. Estudo da estética facial visando à confecção das próteses faciais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1990.
4. Brito RD, Cardim RH, Pereira SL, Coto NP, Antoniazzi, T. F. Estudo do uso potencial da Fitoterapia na higienização de próteses oculares. Rev Paul Odontol. 2008 mar-maio;30(1):26-9.
5. Turano JC, Turano ML, Turano MV. Fundamentos da prótese total. São Paulo: Editora Santos; 2010.
6. Lode HM. Clinical impact of antibiotic-resistant gram-positive pathogens. Clin Microbiol Infect. 2009 Mar;15:212-17.
7. Gonzales FP, Maisch T. XF drugs: A New family of antibacterials. Drug News Perspect. 2010 Apr;23(3):167-74.
8. Milovic NM, Wang J, Lewis K, Klivanov, AM. Immobilized N-Alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed. Biotechnol Bioeng. 2005 Jun;90(6):715-22.
9. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant staphylococcus aureus Infections in the United States. J Am Med Assoc. 2007 Oct;298(15):1763-71.
10. Mansur-Azzam M, Hosseinidousta Z, Wooa SG, Vyhnalkova R, Eisenberg A, Theo GM. Bacteria survival probability in bactericidal filter paper. Colloids Surf B: Biointerfaces. 2014 May;117(1):383–8. doi:10.1016/j.colourfb.2014.03.011.

¹ De acordo com o estilo Vancouver.

11. Bonilla AM, Garcia MF. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progr Polymer Sci.* 2012 Feb;37(2):281-339.
12. Calister Jr WD. *Ciência e engenharia de materiais – uma introdução*. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC Editora; 2002.
13. Peyton FA. History of resins in dentistry. *Dent Clin North Am.* 1975 Apr;19(2):21-2.
14. 75. Graziani M. *Prótese maxilo-facial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Científica; 1956.
15. Anusavice KJ, Chen S, Rawls RH. editors. *Philips materiais dentários*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan; 1998.
16. Akova T, Ozkomur A, Uysal H. Effect of food-simulating liquids on the mechanical properties of provisional restorative materials. *Dent Mater.* 2006 Dec;22(12):1130-4.
17. Luiz BKM. *Resinas compostas fotoativadas: propriedades micro e macroscópicas após cura e armazenadas em meios que simulam dieta [tese]*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.
18. Sideridou D, Achilias DS, Kyrikou E. Thermal expansion characteristics of light-cured dental resins and resin composites. *Biomaterials.* 2004 Jul;25(15):3087-97.
19. Anusavice KJ. *Philips science of dental materials*. 10 ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996.
20. Craig RG. *Restorative dental materials*. 10 ed. Saint Louis: Mosby; 1997.
21. Zhao X, Zhang Y. Bacteria-removing and Bactericidal Efficiencies of PDADMAC Composite Coagulants in Enhanced Coagulation Treatment. 2012Nov; 41(1):37-42.

22. Neves ACC, Rode R, Rode SM, Jorge AOC. Avaliação clínica e microbiológica da secreção conjuntival em usuários de prótese ocular em resina acrílica. Rev Biociências. 2001 Jan;7(2):43-9.
23. Turrer HDG. Utilização de poliacrilamidas de alto peso molecular na flotação catiônica reversa de minério de ferro [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG; 2004.
24. Siedenbiedel T. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. Polymers. 2012Jan;4(1):46-71.
25. Haldar J, An D, De Cienfuegos L. A, Chen J, Klibanov, A. M. Polymeric coatings that inactivate both influenza virus and pathogenic bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Nov;103(47):17667-71. doi: 10.1073/pnas.0608803103
26. Yong H. Coagulants and flocculants ñ theory and practise. Tall Oaks Publishing, Inc; 1995. 86p.
27. Solomons G, Fryhle C. Química Orgânica. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
28. Fontes ST. Tetrahidrofurano como solvente de adesivos Odontológicos. [dissertação]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia; 2009.
29. Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 5º ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
30. Carlile MJ, Watkinson SC. The fungi. 2ª ed. New York: Academic Press; 1995.
31. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The Yeasts: a Taxonomic Study. 5ª edição, v.2; Editora Elsevier Science B. V.; 2011.
32. Shepherd MG. Chapter 2: Biology of *Candida species*. In. Samaranayake LP, MacFarlane TW. Oral Candidosis. London :Wright; 1990. p.10-20.

33. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995 Jul;141 (Pt 7):1507-21.
34. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Mello NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. São Paulo: Savier, 2002. p.156-65, 929-1060.
35. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC. *Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica; 2001.
36. Moragues MD, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Sevilla MJ, Conti S, Polonelli L, Pontón J.. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-C albicans activities. *Infect Immun*, v. 71, p. 5273-79, 2003.
37. COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Robbins. *Patologia estrutural e funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000.
38. Neville BW, Damm DD. *Patologia oral e maxilofacial*. 4º Edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
39. Martins JEC, Melo NT e Heins-Vaccari EM. *Atlas de Microbiologia Médica*, Copyright, Editora Manole Ltda, 2005, pp. 39-45.
40. Person AK, Chudgar SM, Norton BL, Tong BC e Stout JE. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis, *Journal of Medical Microbiology*, 2010;59, 834–38.
41. Dos Santos RLO. *Estudo da eficiência bactericida do biocida policloreto de dialildimetilamônio em materiais usados para confecção de próteses orais e faciais*. [dissertação].São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016.
42. Artandi C. Successful and promising applications of radiation processing - sterilization. *Radiation Physics Chemistry*. Great Britain, 9: 183 - 91, 1977.
43. GIURLIANI, S. *Brasil Nuclear*. Rio de Janeiro; 1994, p.10.

44. Buchalla R, Schuttler C, Bogl KW. Radiation sterilization of medical devices. Effects of ionizing radiation on ultra-high molecular-weight polyethylene. *Radiat Phys Chem.* 1995 Oct;46(4):579-85.
45. American Society for Testing and Materials nomeado Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi. Disponível em <https://www.astm.org/Standards/G21.htm>
46. American Society for Testing and Materials nomeado Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. Disponível em <https://www.astm.org/Standards/E2149.htm>
47. Meyer SA, Altern DG, Yanow D. Genus 4 - *Candida* Berkhout. In: Kreger-Van Rij NJW. *The yeast a taxonomic study.* 3th ed. New York: Elsevier Science B. V; 1984. p. 585-843.
48. Mattei AS. Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar [dissertação] [Internet]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2010 [citado 27 jun 2019]. Disponível em: <http://repositorio.ufpel.edu.br/handle/123456789/2555>.
49. Hernández-Castro F, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Alvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, Torres-Narváez P, Lavalle-Villalobos A. . Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur J Ped.* 2010;169:783-7.
50. Silva HM. Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea. [dissertação] (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública), Faculdade de Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Goiânia; 2011 [citado 27 de Outubro 2015]. Disponível em: <https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/HildeneMeneses2011.pdf?1338299330>
51. Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W, Ruiz Lda S, Franco MC. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006 Jan-Feb;48(1):21-6.

52. Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20(3):233-44.
53. Cardoso PHM, Silva BCM, Santos JI, Dos Santos RLO, Júnior DPL, Auler ME, Ruiz LS, Silva EG, Moreira D, Domaneschi C, Baroni FA, Melhem MSC, Martins MA, Paula CR. Characterization of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* Complex Maintained in Yeast Culture Collection in São Paulo, Brazil. *Open Journal of Epidemiology*, 2018, 8, 76-92.
54. Freshney RI. Biology of the cultured cell. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique* (4 ed). New York: Willey; 200. 577p.
55. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J*. 2005 Aug;38(8):505–9.
56. Cornell RJ, Donaruma LG. 2-Methacryloxytroponones. Intermediates for Synthesis of Biologically Active Polymers. *J Med Chem* 1965; 8: 388–90.
57. Tiller JC. Antimicrobial Surfaces. In: *Bioactive Surfaces*. Borner HG, Lutz J.F, Eds.; Springer-Verlag Berlin: Berlin, Germany; 2011. Volume 240, pp. 193–217.
58. Lee SB, Koepsel RR, Morley SW, Matyjaszewski K, Sun Y, Russell AJ. Permanent, nonleaching antibacterial surfaces. 1. Synthesis by atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules*. 2004 May-Jun;5(3):877-82.
59. Cen L, Neoh KG, Kang ET. Antibacterial activity of cloth functionalized with N-alkylated poly(4-vinylpyridine). *J Biomed Mater Res A*. 2004 Oct 1;71(1):70-80.
60. Ignatova M, Voccia S, Gilbert B, Markova N, Mercuri PS, Galleni M, Sciannamea V, Lenoir S, Cossement D, Gouttebaron R, Jérôme R, Jérôme C. Synthesis of copolymer brushes endowed with adhesion to stainless steel surfaces and antibacterial properties by controlled nitroxide-mediated radical polymerization. *Langmuir*. 2004 Nov 23;20(24):10718-26.
61. Rocha VSM, Dos Santos RLO, Petri DFS, Dias RB, Coto NP. Use of biocides on the surface of materials for making bucomaxillofacial prostheses. *Braz J Oral Max facial Surgery*. 2017;7:21-24.

62. Dos Santos RLO, Gamarra JGA, Lincopan N, Petri DFS, Paula CR, Coto NP, Dias RB. Production of Medical Grade Silicone for Facial Prosthesis with Bactericidal Properties from the Inclusion of Poly (Diallyldimethylammonium Chloride): An in Vitro Study. *Pesq Bras Odontoped Clín Integ*. 2019;19(1):1-6.
63. Santos RLOD, Domaneschi C, Pedroso VB, Florezi GP, Ruiz LDS, Gandra RF, Sugaya NN, Paula CR. Antifungal efficiency of chemically and thermally-activated acrylic resins after surface treatment using poly (diallyldimethylammonium chloride). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019 May 30;52:e20190033. doi: 10.1590/0037-8682-0033-2019.
64. Sanches LM, Petri DF, de Melo Carrasco LD, Carmona-Ribeiro AM. The antimicrobial activity of free and immobilized poly (diallyldimethylammonium) chloride in nanoparticles of poly (methylmethacrylate). *J Nanobiotechnology*. 2015 Sep 24;13:58. doi: 10.1186/s12951-015-0123-3.
65. Feng LJ, Wan Z, Wang XH, Li RY, Liu W. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(5):544-8.
66. Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *Eur J Microbiol Immunol* 2015;5:44e61.
67. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? *J Hosp Infect*. 2016 Nov;94(3):213-27. doi: 10.1016/j.jhin.2016.08.018.
68. Lynch MA, Brightman VJ, Greenberg MS. Oral medicine, diagnosis and treatment. Lippincott Co, Philadelphia; 2008.
69. Livério HO, Ruiz LDS, Freitas RS, Nishikaku A, Souza AC, Paula CR, Domaneschi C (2017) Phenotypic and genotypic detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from oral mucosa of AIDS pediatric patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 13;59:e14. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759014>.

70. Jafari Z, Motamedi M, Jalalizand N, Shokoohi GR, Charsizadeh A, Mirhendi H. Comparison of CHROMagar, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, and polymerase chain reaction-fragment size for the identification of *Candida species*. *Curr Med Mycol* 2017;3(3):10-5. doi:10.29252/cmm.3.3.10.