UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CINDY RUIZ SPEDO

Efeito da modificação da superfície de materiais resilientes temporários para base de prótese por *Equisetum giganteum* na inibição do biofilme de *Candida albicans*

BAURU
2017

CINDY RUIZ SPEDO

Efeito da modificação da superfície de materiais resilientes temporários para base de prótese por *Equisetum giganteum* na inibição do biofilme de *Candida albicans*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Karin Hermana Neppelenbroek

Versão Corrigida

BAURU

2017

Ruiz, Cindy Spedo

R859e Efeito da modificação da superfície de materiais resilientes temporários para base de prótese por *Equisetum giganteum* na inibição do biofilme de *Candida albicans* / Cindy Ruiz Garcia. – Bauru, 2017.

128 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Karin Hermana Neppelenbroek

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

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

Assinatura:_____

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

A Deus, por me guiar, proteger e me amparar em todos os momentos. Sou grata por tudo que Ele fez e faz por mim, por me conceder força e sabedoria para que este sonho fosse concretizado. Obrigada Senhor por traçar meu caminho com tanto amor e carinho; sem o seu sustento eu não seria nada.

Ao meu esposo, Kleber Spedo, por ser meu porto seguro, meu amigo, meu parceiro em todo momento, por me incentivar a buscar meus objetivos e não medir esforços para que isso aconteça. Obrigada por fazer dos meus sonhos os seus! Agradeço imensamente a sua paciência e o seu tempo dedicado dia a dia, em todos os momentos, mostrando o quão imensurável e poderoso é o seu amor. Você me tomou pela mão, prometeu cuidar de mim sempre e até agora você fez tudo isso e até mais. Admiro muito a sua determinação, a sua honestidade e o seu otimismo com a vida. Esta conquista é mérito nosso. Tudo que faço é pensando no melhor que posso te oferecer. Te amo!

À minha família, aos meus pais Johnny Ruiz e Gladis Garcia e às minhas irmãs Candy e Cinthya, que me apoiam e torcem sempre para que meus desejos sejam concretizados. Vocês são meus maiores incentivadores mesmo nos momentos mais conturbados, nos quais eu sentia que não conseguiria e me inspiraram todos os dias a ser uma pessoa melhor. Obrigada a todos pelo amor, compreensão e por serem fonte de alegria e determinação.

Amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Em especial, a **Prof. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek,** minha orientadora e professora, pelo qual tenho profunda admiração e respeito. Ainda lembro o dia em que nos conhecemos e a senhora disse que "eu não tinha a colocado como orientadora no dia da minha prova de seleção", quando fiquei assustada e sem palavras. O meu espanto logo deu espaço para a grande afeição e carinho que tenho pela senhora. Admiro sua competência, generosidade, paciência, amizade e dedicação. Obrigada pelo incentivo, pelas oportunidades, por acreditar em mim e fazer parte do meu crescimento profissional. É uma honra ser sua orientada!*

*Ao nosso grupo de pesquisa: suas filhas **Jana, Andrea, Juliana , Jozely, Carol e Thaís,** que com grande generosidade me guiaram e incentivaram. Obrigada por tudo e contem sempre comigo!*

*À **Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP)**, na pessoa da sua Diretora, **Profª Drª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, minha segunda casa. Os conhecimentos aqui adquiridos são infindáveis. Não há dúvidas que essa escola é um divisor de águas na minha formação. Sinto muito orgulho de ser agora uma filha desta escola.*

*Ao **Departamento de Prótese da FOB-USP**, representado pelo Paulo César Rodrigues Conti, fazendo-se membro junto aos professores doutores: Prof. Dr. José Henrique Rubo, Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, Carlos dos Reis Pereira de Araujo, Estevam Augusto Bonfante, Gerson Bonfante, Accacio Lins do Valle, Lucimar Falavinha, Pedro César Garcia de Oliveira, Renato de Freitas, Simone Soares, Vinícius Carvalho Porto e Wellington Cardoso Bonachela. A admiração e inspiração que tenho por todos é imensurável. Agradeço por compartilharem seus conhecimentos durante esses anos.*

AGRADECIMENTO

*Ao **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, a quem tenho profunda admiração e respeito. Obrigada pela orientação que o senhor me concedeu, a qual me introduziu à família USP e, então ao Mestrado.*

*Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**, exemplo de educador e o alicerce da Pós-Graduação em Reabilitação Oral da FOB-USP. A generosidade, a paciência e o amor com que se dedica às atividades acadêmicas é de uma nobreza sem igual. Obrigada pelos ensinamentos e por me inspirar sempre.*

*Ao **Prof. Dr. Accacio Lins do Valle**, a quem tenho profunda admiração e respeito. Obrigada pelos conhecimentos adquiridos durante o Mestrado, por me dar a oportunidade de trabalhar com o senhor e acompanhar cada etapa desse estudo. Agradeço por ter me acolhido de braços abertos e tornar essa caminhada mais prazerosa. Generosidade, paciência e ética são sua marca registrada e um modelo a ser seguido Vou sentir muita saudade da sua alegria e de nossas saídas para jantar.*

*À **Prof. Dr. Lucimar Flavinha**, a quem tenho um grande carinho, admiração e respeito. Obrigada por me acolher como filha e por me ensinar o significado do amor de uma maneira diferente. Muito obrigada pelo seu tempo, seus conselhos e sua alegria contagiante, por me abrir a porta da sua casa e do seu coração. Adoro-te.*

*Ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório**, pela análise estatística e pelas contribuições no design desse trabalho. Muito obrigada pela sinceridade e delicadeza que trabalha.*

*À secretária do Departamento de Prótese **Déborah Andrea Riêra Blasca**, por toda paciência e comprometimento. Aos funcionários: **Cleide Vital Martins, Marcelo Giatti, Valquíria Nogueira** e **Ziley Mara Calepso de Castro**, pela atenção e solicitude. Em especial, ao técnico de prótese **Reivanildo Viana**, pela delicadeza e disposição de sempre.*

À equipe de Pós-Graduação da FOB-USP, ***Cleusa Gonçalves Leite*** *e* ***Hebe Joselina de Freitas Pereira****, pessoas excepcionais que desempenham papel fundamental para que as clínicas acontecessem e por todo carinho e alegria com que me receberam. Às secretárias* ***Ana Letícia Polombo Momesso, Fátima Cassador Carvalho*** *e* ***Leila Regina da Silva Yerga Sanchez,*** *meus sinceros agradecimentos.*

Aos meus ***colegas de Pós-Graduação,*** *Ilana Ramalho, Andréa Falcão, Thereza Pacheco, Verena Cunha, Patrick Alves, Oscar Marcillo, Vinícius Rizzo, Guilherme Moreira, Naila Machado, Fernanda Sampaio, Fernanda Furtado Piras, Fernanda Ferruzi, Leonardo Marques, Denise Gusmão, Vinicius Fardin, Camila Machado, Henrique Quevedo, Janaína Maciel, Ernesto Benalcázar, Ana Paula Chappuis, Leadiane Sandes, Jéssica Moreno, Cristiane Marques, Bárbara Margarido Brondino, Milena Steluti Marques, Letícia Fiedler, Laila Aguiar, Clara Fassoni Bonachela, Adolfo Coelho, Rodrigo Moreira, Nicole Freitas, Thais Fuzer, Luisa Guerrin, deixo meus sinceros agradecimentos por todo conhecimento compartilhado, companheirismo e convívio harmonioso.*

À amiga ***Fernanda Araújo Sampaio!*** *Não tenho palavras para descrever o quanto você foi e é importante na minha vida! Amiga, você esteve comigo nos momentos mais difíceis que a vida me apresentou, você me estendeu a sua mão, abraçando-me e acolhendo-me com muito amor. Faltam palavras para descrever a imensa gratidão e a profunda admiração que tenho por você. Seu caráter, respeito com o próximo, determinação e generosidade são qualidades que devem servir de exemplo para qualquer pessoa! Obrigada pelo convívio, por tornar essa faz da minha vida mais leve, pelos conselhos, pelas alegrias e pelas tristezas compartilhadas. Tenho certeza que Deus preparou nosso encontro com muito zelo, e é dessa forma que quero manter nossa amizade!*

À amiga ***Janaina Maciel Gomes,*** *por quem tenho profundo carinho. Você é uma pessoa sensacional, com um alto astral, você e única e querida. Muito obrigada por todos os momentos de trabalho, ajuda e por compartilhar comigo vários momentos prazerosos. Te desejo as melhores coisas que a vida pode oferecer, porque você merece. Conte sempre comigo!*

*Às amigas **Samira Sandy** e **Dyna Mara** Ferreira, por serem minhas companheiras nesta caminhada. Obrigada por todo incentivo, conversas sinceras e alegria. Os meus dias são mais leves com vocês!*

*Ao **Centro Integrado de Pesquisa**, representado pelo Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, pela receptividade com a qual sempre fui tratada e pelo compartilhamento de conhecimento. Aos seus funcionários, **Marcia, Marcelo e Rafaela,** por terem aberto as portas do laboratório, agradeço por toda ajuda e pelo companheirismo e por me aceitarem como parte do grupo de pesquisa, tornando essa pesquisa possível. Não foi nada fácil, mas juntos conseguimos!*

*À **Profª Drª Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro**, muito obrigada pela oportunidade de trabalhar no laboratório do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista de Bauru e contribuir pelo desenvolvimento dessa pesquisa. A senhora me acolheu de braços abertos e não tenho palavras para expressar minha gratidão, Obrigada ao pós-graduando **Leonardo Saldanha** pela disponibilidade, orientações e ajuda com os equipamentos para a condução desta pesquisa. Sua dedicação e paciência comigo foram essenciais para adquirir os conhecimentos necessários para a metodologia deste estudo pudesse ser desenvolvida. Muito obrigada pela sua amizade e carinho; vou sentir saudades.*

*À **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de Mestrado, auxílio indispensável para a realização deste trabalho.*

*À **minha família bauruense**, sogra **Ivanil,** cunhados **Clodoaldo** e **Marcelo**, cunhadas **kelly** e **Luciana**, sobrinhos de coração, **Matheus, Julia, Nicolas e Gabriela** e tias de coração **Dalva e Elaine,** muito obrigada por serem meu porto seguro e alicerce. Sem sua dedicação, zelo, amor e acima de tudo, orações, esse sonho não poderia ser realizado. Amo todos vocês!*

Aos meus padrinhos de casamento ***Fernando e Luciane Rocha*** *e* ***Ricardo e Daniele Falsetti,*** *exemplos de dedicação, honestidade, perseverança e fé. Obrigada pelas orações, incentivo e força!*

À ***minha família peruana****:* ***avós, tios, tias, primos*** *e* ***primas****, pelo apoio e companheirismo, mesmo à distância. É muito bom saber que sempre podemos contar uns com os outros. Vocês são fonte de felicidade e dedicação. A saudade é grande, mas quando estamos juntos, tudo é recompensado. Amo muito vocês!*

Aos amigos ***Olga Pereira, Cristie Whitehead, Adela Ruiz, Cecilia Vela, Danitza Vela, Pedrito Pena, Raul Wong, Karolin Rodriguez.*** *Amizades de longas datas que a distância só fortaleceu. Obrigada pelas doses diárias de alegria!*

Aos ***professores integrantes da banca examinadora****, pela disponibilidade em analisar, avaliar e contribuir para aprimorar o presente trabalho.*

A todos que direta ou indiretamente torceram por mim, meu muito obrigada!

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade in vitro da modificação superficial de materiais resilientes temporários para base de prótese por *Equisetum giganteum* sobre o biofilme de *Candida albicans* ao longo da vida útil desses produtos. Corpos de prova circulares (10 mm x 1 mm) do condicionador tecidual Coe-Comfort e reembasador macio temporário Coe-Soft foram superficialmente modificados pela aplicação de um *primer* indicado para melhorar a interface de união resina acrílica de base protética/material reembasador (Rite-Line) misturado ou não (controle) às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antimicrobianos testados: 0,100 g/mL para o extrato hidroetanólico de *E. giganteum* e 0,016 g/mL para o fármaco puro nistatina (grama de fármaco por mililitro de *primer*). Então, o biofilme de uma das cepas de *C. albicans* (SC 5314 e ATCC 90028) foi formado sobre as amostras nos períodos de 24 h, 7 ou 14 dias. Para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), a suspensão fúngica foi sequencialmente diluída e plaqueada em Agar Sabouraud Dextrose. Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas. A efetividade do tratamento superficial dos materiais pelo fitoterápico foi expressa em porcentagem de inibição fúngica em relação ao controle (apenas *primer* sem fármaco). Os dados percentuais foram analisados estatisticamente por ANOVA 4 fatores, seguida pelo teste de Tukey (α=0,05). A inibição do biofilme fúngico não variou significativamente em função do tipo de material resiliente temporário ou cepa de *C. albicans* testada (P>0,05). Embora a nistatina tenha resultado em maiores porcentagens inibitórias médias nos períodos de 24 h (100%) e 7 dias (99,63%) em relação ao *E. giganteum* (24 h: 85,90%; 7 dias: 93,85%) (P<0,05), não houve diferença estatisticamente significante entre os fármacos ao final de 14 dias quando comparados ao controle (*E. giganteum*: 97,03%; nistatina: 99,99%) (P>0,05). Os resultados mostraram que o *E. giganteum* foi liberado de forma efetiva e gradual a partir da superfície de materiais resilientes temporários para base de prótese. Como consequência, a efetividade contra o biofilme de *C. albicans* foi mantida durante ao longo da vida útil desses materiais, que é semelhante ao período do tratamento convencional com antifúngico tópico para estomatite protética (14 dias), sugerindo que esse protocolo pode ser uma alternativa promissora aos fármacos alopáticos destinados a essa terapia.

Palavras-chave*: Reembasadores de Dentadura; Estomatite sob Prótese; *Candida albicans;* Anti-infecciosos; Fitoterápicos*.

*Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio http://decs.bvs.br

ABSTRACT

Effect of surface modification of temporary resilient denture liners by *Equisetum giganteum* on inhibition of *Candida albicans* biofilm

The aim of the present study was to evaluate the in vitro effectiveness of the surface modification of temporary resilient denture liners by *Equisetum giganteum* on the biofilm of *Candida albicans* throughout the lifespan of these products. Disc specimens (10 mm x 1 mm) of tissue conditioner Coe-Comfort and temporary resilient liner Coe-Soft were superficially modified by application of a primer for denture base acrylic resin/reline material interface to enhance the bonding between these materials (Rite-Line) mixed or not (control) to minimum inhibitory concentrations (MICs) of the tested antimicrobials: 0.100 g/mL for the hydroethanolic extract of *E. giganteum* and 0.016 g/mL for the pure drug nystatin (gram of drug per milliliter of primer). Then, biofilm of one of *C. albicans* strains (SC 5314 and ATCC 90028) was formed on the samples in the 24 h, 7 or 14 day periods. For the count of colony-forming units (CFU/mL), fungal suspension was sequentially diluted and plated on Sabouraud Dextrose Agar. All procedures were performed in triplicates. The effectiveness of the superficial treatment of the materials by the phytotherapic was expressed in percentage of fungal inhibition in relation to the control (only primer without drug). The percentage data were analyzed statistically analyzed by 4-way ANOVA followed by Tukey's test (α=0.05). Inhibition of fungal biofilm was not significantly influenced by the type of temporary resilient material or *C. albicans* strain tested (P>0.05). Although the nystatin resulted in higher inhibitory percentages in the periods of 24 h (100%) and 7 days (99.63%) in relation to *E. giganteum* (24 h: 85.90%, 7 days: 93.85%) (P<0.05), there was no statistically significant difference between the drugs at the end of 14 days when compared to the control (*E. giganteum*: 97.03%, nystatin: 99.99%) (P>0.05). The results showed that *E. giganteum* was effectively and gradually released from the surface of temporary resilient denture liners. As a consequence, an efficacy against *C. albicans* biofilm was maintained over the lifespan of these materials, which is the period of conventional treatment with topical antifungal for denture stomatitis (14 days), suggesting that this protocol may be an promising alternative to allopathic drugs for this therapy.

Key-words*: Denture Liners; Denture Stomatitis; *Candida albicans;* Anti-Infective Agents; Phytotherapeutic Drugs*.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 ARTIGO 25

2.1 Resumo 26

2.2 Introdução 27

2.3 Materiais e Métodos 29

2.3.1 Obtenção do fitoterápico e preparo do extrato 29

2.3.2 Confecção dos corpos de prova 30

2.3.3 Reativação das cepas e preparo do inóculo 31

2.3.4 Adesão celular e formação do biofilme 32

2.3.5 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL) 32

2.4 Resultados 34

2.5 Discussão 35

2.6 Referências 42

2.7 Tabelas 46

3 DISCUSSÃO 53

7 CONCLUSÕES 77

REFERÊNCIAS 81

APÊNDICE 105

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética, considerada a forma mais comum de candidose bucal, tem sido relatada em 11 a 88% dos portadores de próteses removíveis (AKPAN; MORGAN, 2002; BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; RAMAGE et al., 2004; WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005; FIGUEIRAL et al., 2007; FREITAS et al., 2008; RABIEI et al., 2010; GENDREAU; LOEWY, 2011; GIANNINI; SHETTY, 2011; SALERNO et al., 2011; GONZALEZ-SERRANO et al., 2016; AOUN; BERBERI, 2017; RIVERA; DROGUETT; ARENAS-MARQUEZ, 2017). Essa recorrente patologia pode se manifestar clinicamente por meio de diferentes níveis de inflamação e eritema nos tecidos de suporte da prótese, variando de múltiplos pontos hiperêmicos a áreas eritematosas difusas e hiperplasia papilar (NEWTON, 1962). A estomatite protética apresenta-se frequentemente assintomática, mas quando os sinais e sintomas estão presentes, ocorrem em forma de sangramento da mucosa bucal, inchaço, prurido, desconforto, ardor, halitose, gosto desagradável e xerostomia, além de lesões associadas, como queilite angular e glossite romboide mediana (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; ARENDORF; WALKER, 1987; JEGANATHAN; LIN, 1992; SALERNO et al., 2011).

Embora tenha sua etiologia reconhecida como multifatorial, a infecção por *Candida* tem sido apontada como o principal fator associado à estomatite protética (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; BANTING; HILL, 2001; RAMAGE et al., 2004; MARTORI et al., 2014). Aproximadamente 93% dos indivíduos com sinais clínicos dessa patologia apresentam infecção fúngica (MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; BANTING; HILL, 2001; PIRES et al., 2002; BAENA-MONROY et al., 2005), sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente, identificada em 50 a 98% dos casos (MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; PIRES et al., 2002; BAENA-MONROY et al., 2005; SANITA et al., 2011; MIMA et al., 2012; SILVA et al., 2012; TAY et al., 2014; AOUN; CASSIA, 2016; MOOSAZADEH et al., 2016). Dessa forma, são relevantes os fatores etiológicos locais e sistêmicos relacionados com a capacidade de adesão e proliferação de *Candida* spp. nos tecidos bucais do paciente, que podem levar ao desenvolvimento da estomatite protética quando as condições do ambiente bucal se tornam favoráveis, e também quando os fatores sistêmicos levam a uma diminuição

dos mecanismos de defesa do organismo (BILHAN et al., 2009; SALERNO et al., 2011).

Fatores etiológicos sistêmicos como debilidade física, alergias, idade (WEERASURIYA; SNAPE, 2008), gênero, tabaco, álcool (BARBEAU et al., 2003; SOYSA; ELLEPOLA, 2005), endocrinopatologias (DORKO et al., 2001; GONZALEZ-SERRANO et al., 2016), deficiências nutricionais (RITCHIE et al., 1969; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990), antibióticos de amplo espectro (RITCHIE et al., 1969; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; DORKO et al., 2001; SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2008), imunossupressores, terapias antineoplásicas (GOLECKA et al., 2006) e alterações nos mecanismos imunológicos podem influenciar no desenvolvimento da estomatite protética (PEREZOUS et al., 2005; DOROCKA-BOBKOWSKA et al., 2010; SALERNO et al., 2011). Ainda, fatores locais associados às próteses têm sido considerados determinantes, sendo os principais a presença de biofilme (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; BANTING; GREENHORN; MCMINN, 1995; RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999; PEREIRA-CENCI et al., 2008), o trauma local causado pelas próteses, sobretudo as antigas e mal adaptadas, com instabilidade oclusal e dimensão vertical reduzida (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; ARENDORF; WALKER, 1987; COELHO; SOUSA; DARE, 2004; GENDREAU; LOEWY, 2011), a xerostomia (SHIP; PILLEMER; BAUM, 2002), o uso contínuo das próteses (WEBB et al., 1998; BARBEAU et al., 2003; FIGUEIRAL et al., 2007; NEPPELENBROEK et al., 2008) e a alteração do pH da saliva (LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993; FIGUEIRAL et al., 2007).

Os tratamentos direcionados à estomatite protética são variados, incluindo terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses, substituição de próteses antigas, eliminação de irregularidades anatômicas, restabelecimento de oclusão não traumática, restituição nutricional e remoção das próteses no período noturno (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; CARTER; KERR; SHEPHERD, 1986; LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993; NEPPELENBROEK et al., 2008; SRINIVASAN; GULABANI, 2010). A escolha de um tratamento ou a associação de mais de um deles é um aspecto a ser considerado individualmente.

Para pacientes imunocomprometidos, a terapia antifúngica sistêmica para estomatite protética pode ser recomendada. No entanto, é preciso considerar a possibilidade desses fármacos induzirem efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos (LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993) bem como apresentarem interação com outros medicamentos, resultando em efeitos sistêmicos potencialmente adversos à saúde (HAZIN et al., 2008; CHOI et al., 2010). Ainda, o uso descontrolado dos antifúngicos sistêmicos nas últimas décadas, sobretudo dos azólicos, tem resultado no aparecimento de resistência antimicrobiana pelos fungos (LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993; AREVALO et al., 1994; MARTINEZ et al., 2002; ROGERS, 2002; GOLDMAN et al., 2004; ZOMORODIAN et al., 2011b; PFALLER, 2012). O insucesso do tratamento de estomatite protética com agentes sistêmicos é especialmente atribuído à sobrevivência de *Candida* spp. resultante de concentração insuficiente da medicação nas superfícies das próteses (MATHABA; DAVIES; WARMINGTON, 1995). Assim, é comum a ocorrência de um quadro de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas após a suspensão do tratamento (BERGENDAL; ISACSSON, 1980; KULAK; ARIKAN; DELIBALTA, 1994; BANTING; HILL, 2001; NEPPELENBROEK et al., 2008).

Se a terapia antifúngica tópica for instituída, agentes como a nistatina, o miconazol e a clorexidina podem ser utilizados (LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993; KULAK; ARIKAN; DELIBALTA, 1994; BANTING; HILL, 2001; NEPPELENBROEK et al., 2008). Apesar de tais medicamentos serem eficazes no alívio dos sinais e sintomas da estomatite associada à *Candida* spp, muitas vezes não eliminam completamente esses micro-organismos das superfícies teciduais das próteses (BANTING; HILL, 2001). O sucesso da aplicação tópica de fármacos na cavidade oral pode ser comprometido por vários fatores, incluindo a falta de percepção da infecção pelos pacientes, necessidade de gastos com medicação, uso contínuo das próteses, sabor desagradável do medicamento (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994) e posologia rigorosa (SCHNEID, 1992). Além disso, é difícil manter uma concentração efetiva da medicação nas superfícies e nos tecidos infectados em decorrência do fluxo salivar, dos movimentos da língua e da deglutição, que rapidamente dissolvem e eliminam o fármaco da cavidade bucal (BERGENDAL; ISACSSON, 1980; KONSBERG; AXELL, 1994; BANTING; HILL, 2001).

A insuficiência de concentração adequada de antifúngicos convencionalmente utilizados sobre as superfícies teciduais das próteses também se deve à colonização microbiana em profundidade na resina acrílica (DAVENPORT, 1972; CHAU et al., 1995; PEREIRA-CENCI et al., 2008) e ao complexo biofilme presente nesse substrato (SATO et al., 1997; PEREIRA-CENCI et al., 2008; SALERNO et al., 2011). Tem sido observado por vários pesquisadores (CHANDRA et al., 2001; KUHN et al., 2002; FERREIRA et al., 2009) que, após a adesão inicial dos blastóporos de *Candida* spp. a substratos como a resina acrílica, uma camada de biofilme é rapidamente formada. As células neste sistema são menos susceptíveis a ação de agentes antimicrobianos, havendo aumento do grau de resistência com a maturação do biofilme (MAH; O'TOOLE, 2001).

As próteses removíveis parciais e totais funcionam como agentes catalisadores na iniciação da estomatite protética, pois podem bloquear o fluxo de anticorpos da saliva e a ação mecânica de limpeza da língua, desenvolvendo um ambiente aeróbico e acidulado propício para a proliferação microbiana e a formação de biofilmes (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; MAHONEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998). Assim, é possível sugerir que, mesmo sem outros fatores predisponentes, a superfície interna das próteses removíveis, sobretudos as totais superiores, favorece o desenvolvimento da estomatite protética (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; MIMA et al., 2012), sobretudo quando considerada a capacidade de aderência das células de *Candida* spp. tanto à mucosa bucal quanto à resina acrílica (DAVENPORT, 1970; BUDTZ-JORGENSEN, 1990). Além disso, o contato do biofilme protético com a mucosa de suporte traumatiza os tecidos (ZOMORODIAN et al., 2011a), tornando-os mais propensos às infecções por aumentar sua permeabilidade às toxinas microbianas. Consequentemente, para o tratamento da estomatite protética, é imprescindível adotar métodos que reduzam ou, de preferência, eliminem os micro-organismos dessas superfícies (NEPPELENBROEK et al., 2008).

Os tratamentos da estomatite protética direcionados às próteses removíveis envolvem principalmente métodos para controle de biofilme. A escovação das próteses é o método mais utilizado pelos usuários (COELHO; SOUSA; DARE, 2004), embora seja considerada ineficiente para redução do biofilme protético quando adotada de forma isolada (DILLS et al., 1988; CHAN et al., 1991; BARNABÉ et al., 2004; YILMAZ et al., 2004). Isso tem sido atribuído a fatores como falta de destreza

manual e acuidade visual dos usuários das próteses removíveis, que são geralmente idosos (HOAD-REDDICK; GRANT; GRIFFITHS, 1990), redução da ação da escova dental devido à proteção dos micro-organismos quando inseridos em biofilme (BAENA-MONROY et al., 2005) e presença de porosidades e irregularidades na resina acrílica contaminada em profundidade (CHAU et al., 1995). Neste contexto, a escovação das próteses reembasadas com materiais resilientes deve ser cuidadosamente orientada uma vez que pode resultar degradação dos mesmos bem como no rompimento da interface de sua união à resina acrílica da base pelo efeito abrasivo da ação mecânica, cerdas da escova e partículas do dentifrício (NIKAWA et al., 1992; HERMANN et al., 2008).

Para controle adequado do biofilme protético, tem sido sugerida a associação da escovação a outros métodos como a imersão em soluções químicas à base de hipoclorito de sódio, perboratos, enzimas e clorexidina (SPIECHOWICZ et al., 1990; MOLINARI; RUNNELLS, 1991; LAL et al., 1992; CHAU et al., 1995; PAVARINA et al., 2003; WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005). Apesar de efetivas, essas soluções podem causar efeitos deletérios às propriedades das resinas acrílicas e dentes artificiais para base das próteses (MOLINARI; RUNNELLS, 1991; CAMPANHA et al., 2012; MACHADO et al., 2012). Os agentes de limpeza também podem causar deterioração superficial e alteração na dureza e rugosidade dos reembasadores resilientes (NIKAWA et al., 1994; TAN et al., 2000; YILMAZ et al., 2004; JIN et al., 2005; MURATA et al., 2010; MACHADO et al., 2012), o que favorece ainda mais o acúmulo de biofilme (BOSCATO et al., 2009). Já o método físico de controle de biofilme pela irradiação por micro-ondas, embora efetivo para o tratamento da estomatite protética (BANTING; HILL, 2001; WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005; NEPPELENBROEK et al., 2008), ainda não apresenta um protocolo seguro e definido para sua utilização, além de resultar em efeitos deletérios às propriedades dos dentes artificiais (CAMPANHA et al., 2005; CAMPANHA et al., 2012) e dos materiais reembasadores rígidos (PAVARINA et al., 2005; NOVAIS et al., 2009; MACHADO et al., 2012) e resilientes para base de prótese (DIXON; BREEDING; FALER, 1999; PAVAN et al., 2007; MACHADO et al., 2012).

Uma forma de contribuir com tratamento para estomatite protética é suprimir o contato do biofilme protético da base acrílica com os tecidos infectados. Isso é possível com os procedimentos de reembasamento das próteses, sobretudo com

materiais resilientes (HOLMBERG, 1980; MEDEIROS; PACHECO, 2000; MARÍN ZULUAGA; GOMEZ VELANDIA; RUEDA CLAUIJO, 2011). Esses reembasadores, além de romperem o ciclo da reinfecção pelos micro-organismos presentes na base acrílica (DAVENPORT, 1972), eliminam o trauma causado pelo biofilme protético (ZOMORODIAN et al., 2011a). Uma vantagem adicional associada aos materiais resilientes para base de prótese é a sua capacidade de promover a recuperação dos tecidos injuriados, proporcionando maior conforto ao paciente quando comparados àqueles rígidos (FARRELL, 1975; BROWN, 1988). Entretanto, são difíceis de serem mantidos limpos, pois são mais macios e menos resistentes à escovação que as resinas acrílicas convencionais (MAKILA; HONKA, 1979). Outro problema desses materiais refere-se à sua porosidade e incompatibilidade com soluções de limpeza para próteses, mesmo em curtos períodos de imersão (NIKAWA et al., 1994). Assim, os materiais resilientes, sobretudo os temporários, são considerados facilmente degradáveis e susceptíveis à colonização microbiana (MAKILA; HOPSU-HAVU, 1977; BULAD et al., 2004; TAYLOR et al., 2008; PAVAN et al., 2010).

A incorporação de agentes antimicrobianos/antifúngicos nos materiais resilientes temporários para base de prótese tem sido sugerida para prolongar sua longevidade clínica, prevenir o acúmulo de biofilme protético (DOUGLAS; WALKER, 1973; SCHNEID, 1992; NIKAWA et al., 1997), inibir a colonização por *C. albicans* (QUINN, 1985; CARTER; KERR; SHEPHERD, 1986; GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008; AMIN et al., 2009; FALAH-TAFTI et al., 2010; RADNAI et al., 2010; CHOPDE et al., 2012) e auxiliar no tratamento da estomatite protética (LAMB; MARTIN, 1983; GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008; SKUPIEN et al., 2013). Esse protocolo foi preconizado para permitir a liberação gradual dos fármacos na cavidade bucal, tratando de maneira simultânea os tecidos paraprotéticos injuriados e a infecção por *Candida* ao longo da vida útil desses materiais temporários, (MATSUURA et al., 1997) que corresponde a um período semelhante de tratamento com antifúngico tópico convencional, ou seja, 14 dias (SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994). Idealmente, após esse período, para evitar a recorrência da estomatite protética, os materiais temporários devem ser substituídos por reembasadores de longa duração ou, se necessário, novas próteses podem ser confeccionadas. Nos casos de perda de adaptação das bases protéticas com a área de suporte, o uso de reembasadores resilientes contendo fármacos minimiza o

trauma tecidual e previne o acúmulo de biofilme até que o problema da prótese seja solucionado. Em feridas cirúrgicas, essa combinação pode auxiliar na recuperação tecidual e prevenção de infecção devido à ação antimicrobiana dos agentes incorporados (MATSUURA et al., 1997). Outras vantagens da modificação dos materiais resilientes de curta duração por antifúngicos é a redução da frequência de aplicação (SCHNEID, 1992) e da necessidade de participação dos pacientes durante o tratamento, o que é vantajoso, sobretudo àqueles idosos, institucionalizados e portadores de deficiências físicas e/ou mentais (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994).

Apesar das vantagens terapêuticas apresentadas, tem sido demonstrado que a incorporação de fármacos em concentrações comercialmente disponíveis a materiais poliméricos/plásticos, incluindo algumas marcas comerciais de condicionadores de tecido e reembasadores resilientes, pode afetar suas propriedades como morfologia de superfície (ADDY; HANDLEY, 1981; URBAN et al., 2009), módulo de elasticidade e peso (ADDY; HANDLEY, 1981), resistência à tração (SCHNEID, 1992; URBAN et al., 2009), dureza (URBAN et al., 2015), rugosidade superficial (URBAN et al., 2015) e resistência da união ao descolamento da resina acrílica para base de prótese (ALCÂNTARA et al., 2012). Dessa forma, previamente à utilização desse protocolo como meio alternativo terapêutico para estomatite protética, seria necessário se obter uma matriz polimérica modificada pela adição de antimicrobianos/antifúngicos que mantivesse preservadas as propriedades dos materiais resilientes e que, ao mesmo tempo, fosse eficaz na inibição dos micro-organismos associados a essa patologia.

Na busca por concentrações antifúngicas compatíveis com as propriedades desses materiais, Bueno et al. (2015) determinaram as concentrações mínimas inibitórias (CIMs) para biofilme de *C. albicans* de agentes antifúngicos (nistatina, miconazol, cetoconazol, itraconazol e clorexidina) incorporados em dois materiais resilientes temporários (Trusoft e Softone). Os autores observaram que os melhores resultados, ou seja, as menores CIMs capazes de inibir 90% ou mais do biofilme de *C. albicans* em até 14 dias de incubação, foram observados para nistatina e clorexidina. Foi também demonstrado que as CIMs de ambos os fármacos não interferiram de forma deletéria em diversas propriedades dos materiais resilientes temporários ao longo de sua vida útil como dureza Shore A (BUENO et al., 2017), rugosidade superficial (BUENO et al., 2017), características morfológicas

(SÁNCHEZ-ALIAGA et al., 2013), resistência da união ao descolamento da resina acrílica para base de prótese (SÁNCHEZ-ALIAGA et al., 2016), sorção de água e solubilidade (LIMA et al., 2016a), porosidade (LIMA et al., 2016b) resistência à tração e porcentagem de alongamento (NEPPELENBROEK et al., 2017). Além disso, a nistatina e a clorexidina incorporada em suas CIMs no Trusoft se mostrou biocompatível com a mucosa palatina de ratos em um recente estudo in vivo (HOTTA et al., 2016).

Apesar das vantagens da nistatina, eficaz na inibição de *Candida* spp. e associada à rara detecção de cepas fúngicas resistentes (GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008) bem como dos benefícios da clorexidina, antimicrobiano de largo espectro de ação e indicado em substituição à terapia antifúngica convencional quando esta falha (RYALAT; DARWISH; AMIN, 2011), esses fármacos podem causar efeitos adversos como náusea, vômito, diarreia e dor estomacal ou, até mesmo, certo de grau de toxicidade e interação com outros medicamentos (SALIM et al., 2012b). Embora tais efeitos sejam minimizados com a liberação direta do fármaco no sítio da infecção (ADDY, 1981; GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008; SALIM et al., 2012b), como ocorre quando da incorporação dos mesmos a materiais resilientes temporários, há um interesse exponencialmente crescente em agentes antimicrobianos derivados de plantas medicinais como alternativa às substâncias químicas sintéticas.

Uma ampla variedade de extratos de plantas tem apresentado atividade antifúngica contra *C. albicans*, sugerindo seu potencial para o tratamento da estomatite protética (OTA et al., 2001; CASAROTO; LARA, 2010; MANSOURIAN et al., 2014; ALAVARCE et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; JABEUR et al., 2017). Alguns produtos naturais como própolis utilizado na forma de gel (SANTOS et al., 2008), enxaguatório bucal (CAPISTRANO et al., 2013) ou mucoadesivo (PINA et al., 2017), *Punica granatum* na forma de gel (VASCONCELOS et al., 2003) e *Ricinus communis* na forma de enxaguatório bucal (PINELLI et al., 2013) tem mostrado a mesma eficácia que antifúngicos convencionais no tratamento de pacientes com estomatite protética.

O gênero *Equisetum,* pertencente à família *Equisetaceae*, é constituído na atualidade por 15 espécies conhecidas vulgarmente como “cavalinhas”. *Equisetum*

arvense é uma pteridófita bem conhecida e divulgada, distribuída no hemisfério norte, sendo seus caules estéreis utilizados como medicamentos em diversos países pelos efeitos diurético, antioxidante, relaxante vascular e anti-inflamatório (FARINON et al., 2013; CARNEIRO et al., 2014). O óleo essencial de *Equisetum arvense* exibe atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e micobactérias (RADULOVIC; STOJANOVIC; PALIC, 2006). A espécie *giganteum* é nativa do cerrado da América do Sul e Central e sua composição inclui principalmente flavonoides e flavonas glicosilados, derivados das estirilpironas e do ácido hidroxicinâmico (FRANCESCATO et al., 2013), metais, sílica (OVALLES et al., 1996) e alguns compostos apolares na sua oleoresina, como alcanos, ácidos graxos, ésteres metílicos, triterpenos e esteroides (MICHIELIN et al., 2005).

O fitoterápico *Equisetum giganteum* tem sido amplamente utilizado para fins diuréticos, como hemostático, em condições inflamatórias e até em desordens reumáticas (PEREZ GUTIERREZ; LAGUNA; WALKOWSKI, 1985; CACERES; GIRON; MARTINEZ, 1987; FARINON et al., 2013). Seu extrato alcoólico em concentrações de 16 mg/mL demonstrou ser efetivo contra quatro espécies de bactérias: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecali, Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* (KLOUCEK et al., 2005). Já o extrato aquoso da mesma espécie mostrou um potencial anti-inflamatório interessante em modelo agudo de inflamação de artrite induzida por antígenos, bem como efeito imunomodulador em linfócitos B e T (FARINON et al., 2013). Sua atividade bactericida/fungicida também foi comprovada em estudo prévio contra *C. albicans* (SC 5314), *Escherichia coli* (O:124) e *S. aureus* (ATCC 6538) (ALAVARCE et al., 2015). Recentemente, foi demonstrado que o extrato hidroetanólico *de E. giganteum* afetou o biofilme de *C. albicans* formado em resina acrílica para base protética por meio da redução da biomassa e do número de células vivas (DA SILVA et al., 2017). Além disso, o fitoterápico demonstrou propriedades antiaderentes para *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável para base de prótese e anti-inflamatória sobre monócitos humanos ativados por esse fungo, não comprometendo a viabilidade dos monócitos e de células epiteliais do palato humano (FARINON et al., 2013; ALAVARCE et al., 2015).

Como descrito previamente, o efeito diluente da saliva, a ação de limpeza da musculatura e colonização microbiana em biofilmes complexos tendem a reduzir a

viabilidade dos agentes antimicrobianos tópicos (soluções, géis, enxaguatórios, por exemplo) a uma concentração menor do que a terapêutica (BANTING; HILL, 2001). Dessa forma, as células microbianas na cavidade bucal são expostas a uma limitada ação do agente antimicrobiano durante o tratamento e, ainda, a concentração do fármaco pode variar-nos diversos sítios bucais. Tendo em vista as considerações anteriores, é possível supor que a liberação de agentes antimicrobianos associados aos materiais resilientes após o reembasamento temporário das superfícies acrílicas contaminadas seja uniforme e gradual aos sítios infectados, mantendo-se em uma concentração efetiva, embora menor que a inicial.

Considerando o potencial do método de modificação dos materiais resilientes temporários por fármacos alopáticos no tratamento da estomatite protética e a atividade antifúngica do fitoterápico *E. giganteum*, seria pertinente avaliar a efetividade desse protocolo sobre a inibição do biofilme de *C. albicans* ao longo da vida útil desses produtos para base de prótese.

2 ARTIGO

2 ARTIGO

O artigo do presente estudo foi redigido de acordo com as diretrizes para a submissão de trabalhos do periódico "Phytotherapy Research" (Qualis A2, Fator de impacto: 3,092), disponíveis no **Apêndice A**. Como o texto para o artigo teve que ser muito resumido para seguir tais normas, os detalhes de obtenção do extrato do fitoterápico e as ilustrações relacionadas aos procedimentos realizados durante a metodologia desta investigação estão descritos no **Apêndice B**. Da mesma forma, o **Apêndice C** exibe as tabelas com os dados originais de UFC/mL e as porcentagens de inibição de biofilme de *C. albicans* para as diferentes condições experimentais bem como o sumário da análise de variância.

Efeito da modificação da superfície de materiais resilientes temporários para base de prótese por *Equisetum giganteum* na inibição do biofilme de *Candida albicans*

RESUMO

Avaliou-se efetividade a longo prazo da modificação superficial de materiais resilientes temporários (Coe-Comfort e Coe-Soft) para base de prótese por *Equisetum giganteum* (EG) sobre o biofilme de *Candida albicans*. Na superfície dos corpos de prova foi aplicado um *primer* para material reembasador (Rite-Line) misturado ou não (controle) às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de extrato hidroetanólico de EG (0,100 g/mL) ou nistatina pura- Nis (0,016 g/mL). O biofilme de *C. albicans* (SC 5314 ou ATCC 90028) foi formado sobre as amostras por 24 h, 7 ou 14 dias e, então, procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). As porcentagens de inibição fúngica obtidas com os fármacos em relação ao controle foram obtidas, sendo os dados analisados por ANOVA 4 fatores e teste de Tukey (α=0,05). A inibição do biofilme fúngico não foi alterada em função do material resiliente temporário ou cepa de *C. albicans* (P>0,05). A liberação do EG da superfície dos materiais foi gradativa, o que permitiu que as elevadas porcentagens de inibição fúngica iniciais (próximas a 90%) fossem ainda progressivamente aumentadas com o tempo, resultando, aos 14 dias, em níveis de eficácia estatisticamente semelhantes aos obtidos com a Nis (P>0,05). Portanto, o EG em um sistema de liberação controlada aplicado à base de prótese pode ser uma alternativa futura aos fármacos alopáticos utilizados sob o mesmo protocolo para o tratamento de estomatite protética.

INTRODUÇÃO

O tratamento da estomatite protética, condição que afeta em média 70% dos usuários de prótese totais, continua sendo desafiador devido aos elevados índices de recorrência observados em até duas semanas após sua suspensão (Gendreau and Loewy, 2011). O constante fluxo salivar, a ação de limpeza da musculatura associada e a colonização das bases protéticas por biofilmes complexos acabam por tornar a concentração dos agentes antifúngicos inferior àquela considerada como terapêutica (Santos *et al.,* 2008; Mima *et al*., 2012). A falha da terapia convencional também tem sido atribuída à falta de adesão ao tratamento (Truhlar *et al.,* 1994; Radnai *et al.,* 2010), posologia rigorosa da medicação (Truhlar *et al.,* 1994) e à resistência microbiana apresentada pelos biofilmes fúngicos, sobretudo de *Candida albicans* a agentes antifúngicos e antimicrobianos (Chandra *et al.,* 2001).

A incorporação de fármacos em materiais resilientes temporários para bases de próteses tem sido sugerida com uma terapia em potencial para a estomatite protética, uma vez que os agentes antimicrobianos/antifúngicos são liberados uniforme e gradualmente a partir da matriz polimérica modificada para os sítios infectados, se mantendo em concentração efetiva por um período semelhante ao do tratamento convencional com medicação tópica (Truhlar *et al.,* 1994; Matsuura *et al.,* 1997; Radnai *et al.,* 2010; Salim *et al.,* 2012, Bueno *et al.,* 2015). Uma grande vantagem deste protocolo é que o reembasamento das próteses suprime o contato do biofilme protético com os tecidos injuriados, evitando a reinfecção da mucosa via base acrílica ao mesmo tempo em que ocorre o efeito terapêutico dos fármacos e a prevenção de aderência microbiana por essa ação (Matsuura *et al.,* 1997). Para aderir ao tratamento, o paciente apenas necessita utilizar a prótese reembasada, o que ainda vai lhe causar conforto pelo efeito de amortecimento promovido pelo

material resiliente, com consequente redução de trauma e recuperação da mucosa injuriada (Truhlar *et al.,* 1994; Matsuura *et al.,* 1997).

Apesar dos benefícios da modificação de materiais resilientes de curta duração por fármacos sintéticos, estes podem estar associados a efeitos adversos de toxicidade e interação com outros medicamentos (Salim *et al.,* 2012). Embora tais efeitos sejam minimizados com a liberação direta do fármaco no sítio da infecção (Salim *et al.,* 2012), como ocorre quando da incorporação dos mesmos à matriz polimérica, há um interesse exponencialmente crescente em agentes antimicrobianos derivados de plantas medicinais como alternativa às substâncias químicas sintéticas (Santos *et al.,* 2008), o que também é relevante para a problemática da resistência microbiana aos fármacos convencionais (Rogers, 2002). Diferentemente destes, o produto fitoterápico (fitocomplexo ou extrato bruto) possui a vantagem adicional de ter vários princípios ativos, resultando em uma ação terapêutica menos intensa, que pode reduzir ou até mesmo eliminar seus efeitos colaterais indesejáveis (Santos *et al*., 2008).

Uma ampla variedade de extratos de plantas tem apresentado atividade antifúngica contra *C. albicans*, sugerindo seu potencial para o tratamento da estomatite protética (Ota *et al.,* 2001; Santos *et al.,* 2008; Casaroto and Lara, 2010; Mansourian *et al., 2*014; Alavarce *et al.,* 2015; Da Silva *et al.,* 2017; Jabeur *et al.,* 2017). O gênero *Equisetum,* pertencente à família *Equisetaceae* é constituído na atualidade por 15 espécies conhecidas vulgarmente como “cavalinhas”. O extrato alcoólico de *Equisetum giganteum* tem demostrado efeito antimicrobiano contra vários patógenos bucais como *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* (Kloucek *et al., 2005;* Alavarce *et al*., 2015). O extrato hidroetanólico de *E. giganteum* exibiu propriedades antiaderente para *C. albicans* sobre a superfície acrílica de resina para

base de prótese e anti-inflamatória sobre monócitos humanos ativados por este fungo, não comprometendo a viabilidade dos monócitos nem de células epiteliais do palato humano (Alavarce *et al.,* 2015*)*. Seu extrato aquoso mostrou potencial anti-inflamatório em um modelo agudo de inflamação de artrite induzida por antígenos, bem como efeito imunomodulador em linfócitos B e T (Farinon *et al.,* 2013*)*. Recentemente, foi demonstrado que o extrato hidroetanólico do *E. giganteum* afetou o biofilme de *C. albicans* em resina acrílica para base de prótese por meio da redução da biomassa e do número de células vivas (Da Silva *et al.,* 2017).

Os resultados promissores obtidos com a modificação dos materiais resilientes temporários por fármacos alopáticos no tratamento da estomatite protética sugerem o potencial deste método para os fitoterápicos com atividade antifúngica, tais como o *E. giganteum*. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade da modificação superficial de condicionador tecidual e reembasador macio temporário por *E. giganteum* sobre o biofilme de *C. albicans* ao longo da vida útil desses materiais. A hipótese alternativa testada foi que a aplicação superficial do fitoterápico iria reduzir o biofilme fúngico formado sobre os materiais resilientes temporários em até 14 dias de avaliação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do fitoterápico e preparo do extrato

As partes aéreas do *E. giganteum* foram coletadas em junho de 2016 no Jardim Botânico Municipal de Bauru, SP, Brasil (22°20′30″S e 49°00′30″W). Os espécimes frescos (aproximadamente 5 kg) foram preparados, identificados e depositados na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquista Filho” (Bauru, SP, Brasil) sob o número 5795. As plantas foram secas a 45ºC por 48 h e a matéria-

prima em pó foi extraída (1,468 kg) com solvente orgânico etanol a 70% - EtOH/H_2O (7:3 v/v) em evaporador Rotativo (Heidolph rotavac, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), sendo o extrato mantido congelado até o momento da liofilização (FreeZone® 2.5 Liter Feeze Dry Systems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), para obtenção do extrato hidroetanólico em pó (EtOH 70%), com um rendimento de amostra de 8,24% (Alavarce *et al*., 2015).

Confecção dos corpos de prova

Para este estudo foram selecionados o condicionador tecidual Coe-Comfort-CC (GC Europe, Leuven, Belgium) e o reembasador resiliente temporário Coe-Soft-CS (GC America Inc, Chicago, IL, USA). A nistatina- Nis (Nystatin, CAS Number: 1400-61-9, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) foi testada em sua forma pura para efeito comparativo com o *E. giganteum*- EG por ser considerada como antifúngico de escolha para o tratamento convencional da estomatite protética. Os antimicrobianos na forma de pó foram aplicados sobre a superfície dos materiais resilientes por meio da mistura a um *primer* que faz parte do kit do condicionador tecidual Rite-Line (Rite-Dent Mfg Corp, Hialeah, FL, USA), indicado pelo fabricante para melhorar a união deste com a resina acrílica para a base de prótese.

Ambos os fármacos foram misturados ao *primer* em suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs), determinadas como sendo as dosagens capazes de inibir 90% ou mais do biofilme de *C. albicans* (Bueno *et al*., 2015) formado sobre os corpos de prova dos materiais resilientes temporários em até 14 dias de incubação a 37ºC. Para isso, Nis e EG foram testados em concentrações entre 0,016 a 0,358 g/mL (grama pó de antimicrobiano para mililitro de *primer*) (Chandra et al., 2001) e contra o biofilme de duas cepas de *C. albicans* (SC 5314 e ATCC 90028). As CIMs de cada fármaco foram determinadas para cada material resiliente temporário e

cepa de *Candida* utilizando-se as mesmas metodologias para formação de biofilme e contagem de colônias viáveis descritas a seguir. As CIMs para ambos os materiais resilientes temporários e para as duas cepas de *Candida* em 14 dias de incubação foram, respectivamente, de 0,100 e 0,016 g/mL para EG e Nis.

Os corpos de prova de cada material foram individual e assepticamente confeccionados em câmara de fluxo laminar a partir de uma matriz circular (10 mm x 1 mm), segundo as instruções do fabricante. Após a plastificação do material e remoção dos excessos, o fármaco em sua CIM (nistatina/fitoterápico) foi assepticamente misturado a 1 mL do *primer* e aplicado com *microbrush* estéril sobre a superfície de cada amostra. Aguardou-se um tempo de 2 min para a secagem completa do *primer* para o início da adesão celular e formação do biofilme. Como controle, para cada material, foram confeccionados corpos de prova apenas com aplicação do *primer,* isto é, sem a adição de fármaco.

Reativação das cepas e preparo do inóculo

Previamente à confecção do inóculo, uma alçada de cada cepa de *C. albicans* SC5314 e ATCC 90028 foi descongelada (-70ºC) e semeada em placa de Petri contendo meio de cultura YEPD Agar (Clontech laboratories Inc, Mountain View, CA, EUA) para incubação a 37ºC por 48 h. Então, uma colônia de cada cepa foi removida das placas, ressuspendida em 50 mL de meio de cultura YEPD e mantida overnight (aproximadamente 16 h) em incubadora (Shaker- Mod. 430/RDBP, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brazil) a 30°C, sob agitação de 180 rpm, resultando em uma pré-cultura (Matsuura *et al*., 1997). Para purificação das células, 5 mL da pré-cultura foram retirados e colocados em tubos Falcon de 15 mL submetidos então à centrifugação (Centrífuga mod. 5804 R, Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 4000 rpm por 5 min, sendo desprezado o

sobrenadante resultante do processo. A purificação das células foi realizada por meio de lavagem do pellet com 5 mL de PBS (Phosphate Buffer Solution; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) e homogeneização em vórtex (Agitador de Tubos Tipo Vortex Mod. QL-901 Biomixer, Curitiba, PR, Brasil), seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, com descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido por duas vezes.

O pellet final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuspendido em 1 mL de PBS e diluído a uma concentração de 1:10000. Uma alíquota da diluição foi colocada em câmera de Neubauer para contagem das leveduras em microscópio óptico. Conhecida a concentração final da suspensão, esta foi diluída em PBS para obtenção do inóculo em uma concentração de 1×10^7 células/mL (Chandra *et al.*, 2001; Bueno *et al.*, 2015).

Adesão celular e formação do biofilme

Para a adesão celular, cada corpo de prova foi colocado individualmente em um poço de uma placa de cultura de 24 poços, sendo imerso em 2 mL de inóculo. As placas de cultura foram colocadas em incubadora sob agitação de 75 rpm por 90 min a 37°C. Em seguida, os corpos de prova foram transferidos para outros poços contendo 2 mL de PBS para remoção das células não aderidas. Finalmente, foram imersos em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA), onde permaneceram para formação do biofilme por 24 h, 7 ou 14 dias (Bueno *et al.*, 2015).

Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL)

Após a incubação por um dos períodos, o biofilme de cada corpo de prova foi assepticamente raspado dentro de cada poço de cultura onde o mesmo se localizava após uma primeira lavagem com 1 mL de PBS para a remoção das

células não aderidas. Então, essa suspensão foi homogeneizada por meio de várias pipetagens para, em seguida, serem realizadas as diluições seriadas em PBS entre 10^{-1} a 10^{-4} em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA). As placas foram incubadas a 37ºC por 48 h para a quantificação das colônias viáveis (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brazil) e o cálculo das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

Para essa avaliação, foram produzidas amostras independentes para cada experimento, variando-se: material resiliente temporário (CC e CS), cepa de *Candida* (ATCC e SC), tratamento (Nis, EG e controle-apenas *primer* sem fármaco) e o período de incubação (24 h, 7 e 14 dias). Para se ter um parâmetro da inibição fúngica obtida com o método proposto neste estudo, as cepas de *Candida* foram semeadas diretamente em ágar nos períodos de 24 h, 7 e 14 dias. É importante enfatizar os experimentos foram realizados em três ocasiões distintas com três réplicas para cada condição experimental.

As porcentagens de inibição do biofilme fúngico pelos fármacos aplicados à superfície dos materiais resilientes (tratamento) em relação àquelas obtidas com a aplicação do *primer* apenas (controle) foram calculadas com base na seguinte fórmula: % inibição = valores UFC/mL tratamento/valores UFC/mL controle. Esses dados foram estatisticamente avaliados por meio de análise de variância para quatro fatores de variação (“material”, “cepa”, “tratamento” e “período”), seguida pelo teste de Tukey (α=0,05).

RESULTADOS

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados as médias e os desvios-padrão dos valores de UFC/mL para os materiais CC e CS, respectivamente. Esses resultados evidenciam o elevado crescimento fúngico apresentado pelo controle (*primer* sem fármaco) em relação aos tratamentos com EG e Nis para os dois materiais resilientes temporários testados e ambas as cepas de *C. albicans* em todos os períodos de avaliação. Exceto por uma mínima inibição fúngica em 24 h para a cepa ATCC em ambos os materiais, o *primer* sem fármaco não foi eficiente em reduzir os valores de UFC/mL em comparação aos demais tratamentos. Por essa razão, a análise estatística dos resultados não foi realizada com base nos valores de UFC/mL, mas a partir das porcentagens de inibição do biofilme fúngico pelos fármacos em comparação ao controle.

A Tabela 3 apresenta as médias e os desvios-padrão das porcentagens de inibição do biofilme de *C. albicans* SC e ATCC referentes ao tratamento superficial com os fármacos (EG e Nis) em relação ao controle (*primer* sem fármaco) para ambos os materiais resilientes (CC e CS) nos diferentes períodos de incubação (24 h, 7 e 14 dias). Os resultados da ANOVA demonstraram que houve diferença estatisticamente significante entre os tratamentos (P=0,0000), entre os períodos (P=0,0131) e na interação “tratamento” x “período” (P=0,0015). Uma vez que os resultados da ANOVA demonstraram significância para estes fatores e interação, foi realizado o teste *post-hoc* Tukey. Na Tabela 4 estão expostas as porcentagens de inibição do biofilme fúngico pelos fármacos em relação ao controle e a significância estatística de cada condição experimental. Para ambos os materiais resilientes temporários e independentemente da cepa de *C. albicans*, as mais altas porcentagens de inibição fúngica (próximas a 100%) em relação ao controle foram

obtidas com Nis em todos os períodos de avaliação e EG aos 14 dias de incubação, não sendo observadas diferenças estatisticamente significantes entre essas condições experimentais (P>0,05). Tais porcentagens foram significativamente superiores àquela obtida com EG aos 7 dias de avaliação (P<0,05), que por sua vez não se diferiu estatisticamente da inibição percentual média observada com o mesmo fitoterápico aos 14 dias (P>0,05) (Tabela 4). A porcentagem média de inibição do biofilme de *C. albicans* obtida com EG em 24 h de incubação foi significativamente inferior a todas as demais obtidas em relação ao controle (P<0,05) (Tabela 4).

DISCUSSÃO

A hipótese alternativa testada no presente estudo foi aceita uma vez que os resultados demonstraram que, em relação à aplicação do *primer* apenas (controle), a modificação superficial de ambos os materiais resilientes temporários pelo EG resultou em uma significativa e progressiva inibição percentual do biofilme fúngico para as duas cepas de *C. albicans* ao longo dos 14 dias de avaliação (Tabela 4). A efetividade do tratamento proposto pela modificação superficial dos materiais resilientes de curta duração com EG apresentou-se de maneira semelhante para o condicionador tecidual CC e o reembasador resiliente temporário CS e também para ambas as cepas de *C. albicans* (ATCC e SC). Isso porque as porcentagens de inibição do biofilme fúngico obtidas com EG em relação ao controle para o mesmo período de avaliação se apresentaram estatisticamente semelhante entre materiais e entre cepas, sendo o mesmo comportamento observado com a Nis. Dessa forma, os resultados serão discutidos a partir dos fatores que influenciaram na inibição fúngica,

ou seja, o tratamento superficial com os diferentes fármacos (EG e Nis) e nos três períodos de incubação avaliados (24 h, 7 e 14 dias).

Em 24 h, a aplicação superficial de EG nos materiais resilientes temporários resultou em uma inibição percentual média de 85,90%, a qual foi progressivamente aumentada aos 7 dias (93,85%) e 14 dias de incubação (97,03%). Neste último período, o EG se mostrou tão efetivo quanto a Nis na inibição do biofilme fúngico em relação ao controle. Tais resultados podem ser atribuídos à ação antimicrobiana de alguns de seus compostos.

A composição do EG inclui principalmente flavonoides e flavonas glicosilados da apigenina, quercetina e do campferol, derivados das estirilpironas e do ácido hidroxicinâmico (Francescato *et al.,* 2013) e compostos fenólicos derivados do ácido cafeico e ácido ferúlico (Alavarce *et al*., 2015). Os flavonoides são produzidos por meio do metabolismo secundário das plantas, sendo reconhecidos por sua eficácia medicinal como agentes antivirais, antibacterianos, anti-inflamatórios, anticâncer e hepatoprotetores (Kumar and Pandey, 2013). Foi demonstrado que os derivados de campferol foram os flavonoides mais abundantemente encontrados no EG, sendo seus níveis pelo menos 10 vezes mais elevados que aqueles observados para quercetina (Francescato *et al.,* 2013). Tem sido relatada uma possível associação entre o consumo de alimentos contendo campferol e a redução do risco do desenvolvimento de várias desordens, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (Calderón-Montaño *et al*., 2008). Ainda, o campferol, seus glicosídeos ou as plantas que o contém possuem atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antiprotozoárias (Calderón-Montaño *et al*., 2008 ; Brunskole *et al*., 2009).

Os flavonoides com ação antimicrobiana podem apresentar múltiplos alvos celulares e não apenas um site específico de ação. Uma de suas ações moleculares

é formar complexos com proteínas tanto por meio de forças inespecíficas, como ligações de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos, quanto por ligações covalentes (Cowan, 1999). Assim, seu modo de ação antimicrobiana pode estar relacionado à sua capacidade de inativar as adesinas microbianas, enzimas, proteínas de transporte de envelope celular, entre outras (Cowan, 1999; Calderón-Montaño *et al.,* 2008; Kumar and Pandey, 2013). A inativação de adesinas pelos flavonoides impede ou minimiza a adesão das células fúngicas sobre o substrato para indução da formação do biofilme. Além disso, a permeabilidade da membrana das células fúngicas pode se tornar alterada pela inativação de certas proteínas carreadoras por estes compostos (Cowan, 1999; Calderón-Montaño *et al*., 2008; Kumar and Pandey, 2013). Tem sido demonstrado que alguns flavonoides, como a apigenina e campferol presentes no EG são capazes de interferir com enzimas vitais para o crescimento e virulência de certos fungos, incluindo *C. albicans* (Yordanov *et al*., 2008). O campferol também pode atuar na inibição da melanina, que é um conhecido alvo de fármacos antifúngicos por ser considerado um importante fator de virulência em fungos patogênicos (Brunskole *et al*., 2009). Outros benefícios associados aos flavonoides presentes no EG foram demonstrados em modelos animais experimentais in vivo, como o aumento da sobrevivência de ratos com infecção sistêmica de *C. albicans* após a administração de campferol e a supressão de sintomas e eliminação rápida deste fungo no local de inoculação em animais com infecção cutânea tratados com apigenina e campferol (Yordanov *et al*., 2008). A atividade antifúngica dos flavonoides presentes no EG pode explicar, ao menos em parte, a ação inibitória deste fitoterápico sobre o biofilme de *C. albicans* formado sobre os materiais resilientes temporários observados neste estudo. Outros componentes podem ter contribuído com os resultados favoráveis obtidos com o EG,

entretanto, na literatura disponível, apenas foram encontrados estudos sobre a ação antifúngica dos flavonoides glicosados presentes neste fitoterápico.

Apesar da menor eficácia da Nis em suspensão oral para o tratamento de candidose bucal ou orofaríngea em bebês e indivíduos com HIV/AIDS, este fármaco é ainda considerado o agente de primeira escolha para o tratamento tópico de casos não complicados, incluindo a estomatite protética bem como em pacientes com função imunológica normal (Lyu *et al*., 2016). Por isso, a Nis foi selecionada neste estudo para efeito comparativo com o EG na análise da efetividade do tratamento em associação aos materiais resilientes temporários. Os resultados demonstraram que, durante todo o período de avaliação, a Nis resultou em porcentagens médias de inibição do biofilme fúngico próximas ou iguais a 100%. Tais achados eram esperados, visto que os compostos da classe dos polienos, como a nistatina, possuem o mais largo espectro de ação entre os antifúngicos disponíveis, sendo considerados fungicidas. O efeito inibitório da nistatina é resultado da interação de seus polienos com o ergosterol, o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana e consequente perda de potássio e de outros componentes citoplasmáticos, resultando na morte celular (Rogers, 2002).

As porcentagens iniciais próximas a 90% de inibição do biofilme fúngico obtidas com o EG foram progressivamente aumentadas com o tempo, sugerindo que a aplicação do fitoterápico nos materiais macios por meio do *primer* testado permitiu sua liberação gradual e sempre dentro da CIM desejada. Esse resultado reforça positivamente a terapia com sistema de liberação gradual de fármacos em comparação à terapia convencional com antifúngicos para o tratamento da estomatite protética. Isso porque há a possibilidade de manter uma concentração terapêutica do fármaco na mucosa infectada e superfície interna da prótese pelo

período correspondente à vida útil de um material resiliente temporário para prótese (Schneid, 1992; Truhlar *et al.,* 1994; Matsuura *et al*., 1997), o qual é também equivalente ao tempo médio utilizado para o tratamento convencional para estomatite protética com nistatina tópica (Lombardi and Budtz-Jorgensen,1993; Mima *et al*., 2012), ou seja, 14 dias. Com o revestimento da superfície interna da prótese pelo material alterado superficialmente pelo fármaco, o trauma resultante do biofilme e eventual falta de adaptação da área basal é eliminado e a aderência microbiana passa a ser prevenida, com o restabelecimento do conforto ao paciente (Matsuura *et al*., 1997). Não há informação no MSDS (Material Safety Data Sheet) para o condicionador tecidual Rite-Line, do qual se utilizou o *primer* para a mistura com os fármacos desta investigação, assim como não foram encontrados estudos prévios que tenham utilizado este material. Na sua bula, não são descritas informações sobre a composição química dos produtos do seu kit e o fabricante apenas informa acerca do pó e líquido do material. Pelo MSDS, é possível saber que a maioria dos *primers* que acompanham os kits de pó e líquido dos materiais reembasadores para base de prótese é constituída exclusivamente por monômeros e/ou solventes. Como também não foram encontrados achados disponíveis sobre a aplicação de fármacos misturados a *primers* sobre materiais resilientes temporários, apenas comparações indiretas com tais produtos em polímeros de modo geral serão possíveis de serem estabelecidas para explicar os resultados deste estudo. Os *primers* contêm solventes que podem dissolver a superfície dos polímeros já que se destinam a promover a penetração e a difusão do material reembasador para o interior da resina acrílica de base de prótese, favorecendo a união nesta interface (Arima *et al*., 1996). É possível que a alteração superficial dos materiais resilientes temporários resultante do tratamento com *primer* associado aos fármacos tenha

levado à penetrabilidade desses agentes antimicrobianos para os poros e canaletas criados pela dissolução causada pela ação do (s) solvente (s) de sua composição (Arima *et al*., 1996). Esse efeito permitiu que ambos os fármacos, EG e Nis, fossem mantidos nas superfícies dos materiais durante os 14 dias de avaliação, sendo liberados gradualmente em concentrações inibitórias desejáveis para o biofilme de *C. albicans* ao longo de todo esse período.

Com base no potencial de liberação lenta e gradual do EG verificado com os resultados obtidos neste estudo, sugere-se o tratamento superficial dos materiais resilientes temporários para base de prótese com esse fitoterápico para futuras investigações como uma alternativa ao tratamento convencional para a estomatite protética. Uma grande vantagem desse protocolo é que praticamente não há a necessidade de participação do paciente (Truhlar *et al.,* 1994), que ainda é mais beneficiado se for utilizado um fármaco fitoterápico, como o EG, em detrimento de um alopático, como a nistatina. A frequente recidiva de estomatite protética tem levado ao uso não controlado de medicamentos antifúngicos sintéticos convencionais, o que aumenta as chances de resistência antimicrobiana dos fungos (Rogers, 2002). Ainda, mesmo que a liberação desses fármacos ocorra diretamente para o local da infecção, é possível que durante o tratamento, surjam efeitos secundários sistêmicos (colaterais) e de toxicidade ou, ainda, interações fármaco-fármaco. Tais efeitos podem se comportar de forma diferente entre os indivíduos, dependendo do estado da doença, idade, sexo, peso, entre outros fatores (Lombardi and Budtz-Jorgensen,1993; Rogers, 2002; Casalinuovo *et al.,* 2011).

As limitações do presente estudo incluem que apenas uma marca comercial de cada tipo de material (condicionador de tecido e reembasador resiliente temporário) foi avaliada, não podendo, dessa forma, estender os resultados a outras

marcas. O extrato hidroetanólico do EG foi testado na sua forma bruta, sendo necessárias pesquisas futuras para conhecer qual ou quais componentes apresentaram a ação antifúngica observada. Métodos adicionais para avaliação do biofilme após o tratamento proposto, tais como ensaio de biomassa total por meio da coloração com cristal violeta ou análise da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução de sais de tetrazólio- XTT, não puderam ser utilizados uma vez que as suspensões contendo amostras modificadas pelo fitoterápico apesentam alterações de cor resultantes de seus componenentes, as quais interferem com as metodologias. Ainda, fatores clínicos como o ambiente bucal e a conformação da base da prótese não foram considerados nos métodos desta investigação. Por isso, uma avaliação final do tratamento para estomatite protética com materiais resilientes temporários modificados superficialmente por EG somente poderia ser determinada por meio de estudos clínicos em pacientes.

REFERENCIAS

Alavarce RA, Saldanha LL, Almeida NL, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. The Beneficial Effect of *Equisetum giganteum* L. against *Candida* Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis. 2015. *Evid Based Complement Alternat Med* **2015**: 939625.

Arima T, Nikawa H, Hamada T, Harsini. 1996. Composition and effect of denture base resin surface primers for reline acrylic resins. *J Prosthet Dent* **4**: 457-462.

Brunskole M, Zorko K, Kerbler V, Martens S, Stojan J, Gobec S, Lanisnik RT. Trihydroxynaphthalene reductase of Curvularia lunata-A target for flavonoid action? 2009. *Chem Biol Interact* **178**: 259-267.

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

Casalinuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in Candida albicans: a review of mechanisms. 2004. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **8**: 69-77.

Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. 2010. *Fitoterapia J* **81**: 323-328.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. 2001 *J Dent Res* **80**: 903-908.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. 1999. *Clin Microbiol Rev J* **12**: 564-582.

Da Silva RA, Bernardo LP, Moreno JML, Lara VS, Porto VC. Equisetum giganteum influences the ability of *Candida albicans* in forming biofilms over the denture acrylic resin surface. *Pharm Biol J.* 2017 **55**(1): 1698-1702.

Farinon M, Lora PS, Francescato LN, Bassani VL, Henriques AT, Xavier M, de Oliveira PG. Effect of Aqueous Extract of Giant Horsetail (*Equisetum giganteum L.*) in Antigen-Induced Arthritis. 2013. *Open Rheumatol J* **30**: 129-133.

Francescato LN, Debenedetti SL, Schwanz TG, Bassani VL, Henriques AT. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. 2013. *Talanta J* **15**: 192-203

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. 2011. *J Prosthodont.* **20**: 251-260.

Jabeur I, Martins N, Barros L, Calhelha RC, Vaz J, Achour L, Santos-Buelga C, Ferreira IC. Contribution of the phenolic composition to the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor potential of *Equisetum giganteum L*. and Tilia platyphyllos Scop. 2017. *Food Funct* **22**: 975-984.

Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. 2005. *J Ethnopharmacol* **99**: 309-312

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. 2013. *Scientific World J* **29:** 1-16.

Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. 1993. *Eur J Prosthodont Restor Dent* **2**: 17-22.

Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. 2016. *Drug Des Devel Ther J* **16**: 1161-1171.

Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen Beitollahi J, Shamshiri AR. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum, Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. 2014. *J Mycol Med* **24**: e163-168.

Martin MV. A comparison of fluconazole and ketoconazole in the treatment of rat palatal candidosis. 1989. *J Med Vet Mycol* **27**: 63-70.

Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. 1997. *J Dent* **25**: 373-377.

Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, Pavaina AC. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. 2012. *Clin Microbiol Infect J* **18**: E380-388.

Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. 2001. *Mycoses J*. **44**: 375-378.

Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. 2012. *Am J Med* **125**: S3-13.

Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS. Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of *Candida albicans*. 2010. *Gerodontology J* **27**: 292-296.

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

Salim N, Satterthwaite J, Rautemaa R, Silikas N. Impregnation with antimicrobials has an impact on degree of conversion and colour stability of acrylic liner. 2012. *Dent Mater J* **31**: 1008-1013.

Santos VR, Gomes RT, de Mesquita RA, de Moura MD, Franca EC. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. 2008 *Phytother Res* **22**: 1544-1547.

Schneid TR. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. 1992. *Spec Care Dentist J* **12**: 245-250.

Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. 1994. *J Prost Dent* **71**: 517-524.

Yordanov M, Dimitrova P, Patkar S, Saso L, Ivanovska N. Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. 2008 *Can J Microbiol* **54**: 435-440.

TABELAS

Tabela 1- Médias e desvios-padrão dos valores de UFC/mL obtidos para o condicionador tecidual CC nas diferentes condições experimentais.

Tratamento	Cepa	Período	UFC/mL
Ct	SC	24 h	1405689±1554485
EG	SC	24 h	28356±32810
Nis	SC	24 h	0
Ct	ATCC	24 h	77911±129317
EG	ATCC	24 h	11978±14890
Nis	ATCC	24 h	0
Ct	SC	7 d	8715556±11995123
EG	SC	7 d	129689±124458
Nis	SC	7 d	0
Ct	ATCC	7 d	3035556±3086451
EG	ATCC	7 d	89733±12837
Nis	ATCC	7 d	0
Ct	SC	14 d	7822222±2669165
EG	SC	14 d	382222±492386
Nis	SC	14 d	0
Ct	ATCC	14 d	10311111±8887694
EG	ATCC	14 d	1378±2192
Nis	ATCC	14 d	0

Ct= controle (*primer* sem fármaco); EG= *E. giganteum*; Nis= nistatina

Tabela 2- Médias e desvios-padrão dos valores de UFC/mL obtidos para o reembasador resiliente temporário CS nas diferentes condições experimentais.

Tratamento	Cepa	Período	UFC/mL
Ct	SC	24 h	1265644±1854560
EG	SC	24 h	178689±317835
Nis	SC	24 h	0
Ct	ATCC	24 h	30133±37352
EG	ATCC	24 h	13333±21045
Nis	ATCC	24 h	0
Ct	SC	7 d	9955556±7925741
EG	SC	7 d	485911±551529
Nis	SC	7 d	40711±48763
Ct	ATCC	7 d	2666667±2161296
EG	ATCC	7 d	162667±248630
Nis	ATCC	7 d	1511±2567
Ct	SC	14 d	13600000±13495184
EG	SC	14 d	625244±938229
Nis	SC	14 d	133±283
Ct	ATCC	14 d	4306667±1590723
EG	ATCC	14 d	195778±384292
Nis	ATCC	14 d	0

Ct= controle (*primer* sem fármaco); EG= *E. giganteum*; Nis= nistatina

Tabela 3- Médias e desvios-padrão das porcentagens de inibição do biofilme de *C. albicans* SC e ATCC pelos fármacos (EG e Nis) em relação ao controle para ambos os materiais resilientes (CC e CS) nos diferentes períodos de incubação.

Material	Tratamento	Cepa	Período	% inibição
CC	EG	SC	24 h	91,61 ± 10,73
CC	Nis	SC	24 h	100,00 ± 0,00
CC	EG	ATCC	24 h	90,97 ± 18,17
CC	Nis	ATCC	24 h	100,00 ± 0,00
CC	EG	SC	7 d	91,10 ± 8,87
CC	Nis	SC	7 d	100,00 ± 0,00
CC	EG	ATCC	7 d	96,50 ± 3,71
CC	Nis	ATCC	7 d	100,00 ± 0,00
CC	EG	SC	14 d	96,13 ± 4,95
CC	Nis	SC	14 d	100,00 ± 0,00
CC	EG	ATCC	14 d	99,98 ± 0,011
CC	Nis	ATCC	14 d	100,00 ± 0,00
CS	EG	SC	24 h	77,74 ± 32,72
CS	Nis	SC	24 h	100,00 ± 0,00
CS	EG	ATCC	24 h	83,26 ± 35,31
CS	Nis	ATCC	24 h	100,00 ± 0,00
CS	EG	SC	7 d	96,62 ± 3,30
CS	Nis	SC	7 d	98,58 ± 2,86
CS	EG	ATCC	7 d	91,19 ± 13,97
CS	Nis	ATCC	7 d	99,94 ± 0,05
CS	EG	SC	14 d	96,07 ± 5,38
CS	Nis	SC	14 d	99,99 ± 0,00
CS	EG	ATCC	14 d	95,92 ± 6,74
CS	Nis	ATCC	14 d	100,00 ± 0,00

EG= *E. giganteum*; Nis= nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela 4- Porcentagens de inibição do biofilme fúngico pelos fármacos (tratamento) em relação ao controle (*primer*) e significância estatística na interação "tratamento" x "período".

Tratamento	**Período**	**% de inibição**
EG	24 h	85,90 (A)
EG	7 d	93,85 (B)
EG	14 d	97,03 (B,C)
Nis	24 h	100,00 (C)
Nis	7 d	99,63 (C)
Nis	14 d	99,99 (C)

EG= *E. giganteum*; Nis= nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)
Verticalmente, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre as condições experimentais (tratamento e período) (P<0,05)

3 DISCUSSÃO

3 DISCUSSÃO

Em pacientes parcial ou totalmente desdentados, as próteses removíveis podem causar múltiplas alterações no ambiente bucal, tais como alterações na saliva e nos depósitos de fosfato, cálcio e proteínas nas superfícies acrílicas que estão em contato com os tecidos de suporte, competição entre micro-organismos para aderência ao substrato, diminuição do pH e aumento do potencial de óxido-redução. Como resultado, as espécies de fungos sofrem rápida adaptação osmótica e mudanças metabólicas bem como produzem respostas ao estresse oxidativo, levando à formação de biofilmes (SANCHEZ-VARGAS et al., 2013). Dessa forma, a presença dessas próteses tem sido considerada como um fator predisponente primário para o desenvolvimento da estomatite protética. A composição da comunidade microbiana do biofilme protético é semelhante à do biofilme dental, com exceção de um aumento de *Candida* spp., sobretudo *C. albicans,* o que favorece ainda mais tal predisposição à patologia (DAVENPORT, 1970; PIRES et al., 2002; BARBEAU et al., 2003; BAENA-MONROY et al., 2005; SANITA et al., 2011; MARTINS et al., 2016). Isso porque na estomatite protética, a patogênese refere-se principalmente à manifestação de uma reação de hipersensibilidade mediada por células inflamatórias às espécies de *Candida* (SHANNON et al., 1966; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999). Os mecanismos envolvidos nos processos de adesão, proliferação e invasão tecidual por esses fungos são favorecidos durante as situações de debilidade imunológica do indivíduo, por doenças sistêmicas ou condições locais (ARENDORF; WALKER, 1987; IACOPINO; WATHEN, 1992; BARBEAU et al., 2003; GENDREAU; LOEWY, 2011)

A adesão das células microbianas às camadas epiteliais é uma condição determinante nos processos de colonização e infecção das superfícies mucosas. Além de ser a mais comum entre as espécies de *Candida* em indivíduos com estomatite protética (DAVENPORT, 1970; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; PIRES et al., 2002; BARBEAU et al., 2003; BAENA-MONROY et al., 2005; GENDREAU; LOEWY, 2011; SANITA et al., 2011), a *C. albicans* está primariamente associada à invasão tecidual e ao desenvolvimento do processo infeccioso (WEBB et al., 1998). Essa espécie apresenta capacidade de se aderir firmemente aos tecidos epiteliais, o

que parece envolver interações entre as manoproteínas localizadas nas fibrilas superficiais dessa levedura e os receptores de glicosídeo das células epiteliais (BUDTZ-JORGENSEN, 1990; SALERNO et al., 2011). O mecanismo de adesão também está associado a outras moléculas, como as adesinas (lectinas e glicoproteínas) do agente infectante e receptores proteicos (laminina, fibronectina e fibrina) presentes na superfície celular das mucosas assim como outros fatores de virulência, entre os quais, enzimas extracelulares e toxinas (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; GREENFIELD, 1992).

Durante o processo infeccioso, as espécies de *Candida* spp. promovem a liberação de toxinas (toxicoglicoproteínas e canditoxina), agravando as lesões decorrentes da estomatite protética (IWATA; UCHIDA, 1969; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990). Outros fatores relevantes associados à patogênese desses micro-organismos são a degradação da superfície epitelial pela ação de exoenzimas hidrolíticas e o desenvolvimento de resposta hipersensitiva tardia (MCMULLAN-VOGEL et al., 1999). No hospedeiro, a clivagem de anticorpos, hemoglobina, colágeno e mucina ocorrem pela ação das exoenzimas do tipo aspartil proteinases secretadas pelas espécies de *Candida,* sobretudo *C. albicans.* Já as fosfolipases exibem dupla importância na ação infecciosa por esses fungos uma vez podem atuar no controle do crescimento fúngico e, ao mesmo tempo, causar danos aos constituintes lipídicos da estrutura celular das superfícies da mucosa infectada (BUDTZ-JORGENSEN, 1990; WEBB et al., 1998; SALERNO et al., 2011).

Outra característica importante de infecciosidade é dimorfismo que as espécies de *Candida* possuem, podendo variar rapidamente sua morfologia de levedura (blastóporo) para micelial (pseudohifas e hifas), que é uma forma invasiva (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; OLSEN; STENDERUP, 1990). Quanto mais evidente a presença de formas miceliais, maior a severidade da estomatite protética (SALERNO et al., 2011). A ação imunológica fagocitária é também dificultada pela morfologia micelial, o que favorece ainda mais o desenvolvimento e manutenção da infecção (IACOPINO; WATHEN, 1992). O processo infeccioso desencadeado pelas interações específicas das espécies de *Candida* com as células epiteliais do hospedeiro mencionadas pode ser marcadamente exacerbado por *C. albicans,* considerada como a mais virulenta e patogênica delas, o que deve

ser especialmente considerado na estomatite protética, dada a elevada prevalência deste fungo (SALERNO et al., 2011).

As interações não específicas das espécies de *Candida* com as resinas acrílicas das bases das próteses removíveis também devem ser consideradas na patogênese da estomatite protética (DAVENPORT, 1970; DAVENPORT, 1972; PEREIRA-CENCI et al., 2008; SALERNO et al., 2011). A afinidade e a ligação com o substrato estão diretamente associadas às características hidrofóbicas desses micro-organismos bem como às propriedades superficiais do material tais como rugosidade, porosidade, hidrofobicidade e energia livre de superfície (CHAU et al., 1995; VERRAN; MARYAN, 1997; PEREIRA-CENCI et al., 2008). Na estomatite protética, a capacidade de aderência de *C. albicans* às bases acrílicas é considerada relevante em relação às demais espécies desse gênero (LAL et al., 1992; SALERNO et al., 2011). Apesar de 82 filotipos de bactérias serem identificados em biofilmes protéticos, *C. albicans* foi a única espécie fúngica isolada das próteses dos pacientes com estomatite protética (CAMPOS et al., 2008). Além disso, quando em formas miceliais, *C. albicans* apresenta uma aderência maior à resina acrílica em relação a outras espécies, facilitando o processo invasivo na mucosa de suporte das próteses (WEBB et al., 1998; RAMAGE et al., 2004). Todos os aspectos anteriormente mencionados demonstram os mecanismos de infecciosidade das espécies de *Candida,* principalmente *C. albicans* e a sua importância no desenvolvimento da estomatite protética. Por isso, no presente estudo, visando um protocolo alternativo para o tratamento dessa patologia, foi avaliada a efetividade da modificação superficial de materiais resilientes temporários para base de prótese por *E. giganteum* sobre biofilme de *C. albicans.*

Além das interações com o hospedeiro e com o substrato, as espécies de *Candida* frequentemente se interagem com outros micro-organismos orais, o que resulta na formação de um biofilme complexo, de estrutura organizada e difícil remoção (SATO et al., 1997; RAMAGE et al., 2004; CAMPOS et al., 2008; PEREIRA-CENCI et al., 2008; SALERNO et al., 2011). Os biofilmes constituem uma comunidade estruturada de células microbianas envolvidas em uma matriz polimérica constituída por DNA extracelular, carboidratos, proteínas, hexosamina, fósforo e ácido urônico. Encontram-se aderidos a uma superfície inerte ou viva, sendo conhecidos por conter mais de 10^{11} micro-organismos por grama em peso

seco. Tais comunidades apresentam um fenótipo muito diferente daquele apresentado por células planctônicas (SATO et al., 1997; RAMAGE et al., 2004; CAMPOS et al., 2008). Duas consequências do crescimento de biofilme com grande relevância clínica são: o acentuado aumento da resistência das células microbianas à ação dos agentes antimicrobianos (CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2004) e a maior proteção dos micro-organismos à atuação das células de defesa do hospedeiro (MAH; O'TOOLE, 2001). Baixo crescimento, regulação do metabolismo celular alterada devido à limitação de nutrientes e condições de estresse e a densidade celular são outros mecanismos sugeridos de resistência ao biofilme (SENEVIRATNE et al., 2010). Além disso, os biofilmes representam um preditor significativo de mortalidade (TUMBARELLO et al., 2007; SILVA et al., 2011) e as espécies que produzem biofilmes tem sido correlacionadas aos resultados desfavoráveis em pacientes com infecções, incluindo as recorrências (TUMBARELLO et al., 2012). Considerando esses aspectos e, dessa forma, visando aproximar as condições in vitro daquelas encontradas clinicamente, os testes microbiológicos deste estudo foram realizados com biofilme e não células planctônicas de *C. albicans*. Ainda com o intuito de aumentar relevância clínica, além da cepa-padrão ATCC 90028, utilizou-se na presente metodologia a cepa-padrão SC 5314, proveniente de isolado clínico, por sua maior capacidade de formar biofilmes, mesmo em condições adversas (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007).

Adicionalmente aos aspectos supracitados, a formação do biofilme nas superfícies internas das próteses removíveis é considerada como uma das principais razões para a falha das terapias antifúngicas convencionais (tópicas e sistêmicas) para a estomatite protética, pelas características inerentes a essas regiões. As superfícies internas das próteses, não polidas como as externas, apresentam maior rugosidade, o que aumenta ainda mais a retenção do biofilme e sua resistência às forças de cisalhamento da escovação e à ação de agentes antifúngicos e químicos de limpeza (PEREIRA-CENCI et al., 2008). As células de *Candida* do biofilme protético, que sobrevivem após o tratamento mecânico ou químico da superfície acrílica, constituem uma subpopulação celular altamente tolerante (persistente), que é capaz de restaurar o biofilme na presença de nutrientes, resultando em recorrência da estomatite protética (LEWIS, 2012). Assim, para se conseguir a efetividade do

tratamento dessa patologia em longo prazo, a terapia deve focar na remoção do biofilme protético de forma a evitar o ciclo de reinfecção da mucosa de suporte via prótese.

A incorporação de CIMs de nistatina, clorexidina e cetoconazol em condicionadores de tecido e reembasadores resilientes temporários para base de prótese tem se mostrado efetiva para a inibição de *C. albicans* (BUENO et al., 2015), sem interferir deleteriamente com propriedades físicas, mecânicas e biológicas desses materiais ao longo de sua vida útil (14 dias) (SÁNCHEZ-ALIAGA et al., 2013; LIMA et al., 2016a; LIMA et al., 2016b; SÁNCHEZ-ALIAGA et al., 2016; SÁNCHEZ-ALIAGA et al., 2016; BUENO et al., 2017; NEPPELENBROEK et al., 2017). Esse método pode ser considerado como um tratamento promissor para a estomatite protética por várias razões: 1) o biofilme protético é removido de forma mecânica com o desgaste da base acrílica para permitir espaço para o material reembasador e, com isso, a reinfecção via prótese infectada é impedida; 2) a colocação dos materiais resilientes macios permite sua recuperação pelas características de resiliência e pela readaptação da prótese resultante do reembasamento; 3) durante o período de vida útil dos materiais resilientes temporários (14 dias), que equivale ao tempo médio da terapia com antifúngicos convencionais, os fármacos incorporados na matriz polimérica são liberados gradativamente aos tecidos infectados, tratando os sinais e sintomas da patologia e prevenindo a formação de biofilme; 4) concluído o período de utilização do material resiliente temporário, a infecção na mucosa recuperada do trauma do biofilme e da desadaptação das bases acrílicas é prevenida de recorrência com a realização de um reembasamento de longa duração ou confecção de novas próteses (CARTER; KERR; SHEPHERD, 1986; SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994; MATSUURA et al., 1997).

Apesar das vantagens apresentadas com esse protocolo para o tratamento da estomatite protética, os fármacos sintéticos, mesmo em concentrações menores e direcionadas ao sítio de infecção, o que é permitido pelo sistema de liberação gradual a partir da matriz polimérica, é possível que surjam efeitos secundários sistêmicos (colaterais) e de toxicidade ou, ainda, interações fármaco-fármaco. Tais efeitos podem se comportar de forma diferente entre os indivíduos, dependendo do estado da doença, idade, sexo, peso, entre outros fatores. Efeitos secundários comuns de fármacos antifúngicos incluem náuseas, dor de estômago, diarreia, dor

de cabeça e indigestão (LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993; ROGERS, 2002; CASALINUOVO; DI FRANCESCO; GARACI, 2004). Além disso, a frequente exposição aos agentes antifúngicos sintéticos convencionais tem resultado no aparecimento de espécies fúngicas resistentes, sobretudo quando inseridas em biofilmes, sejam esses simples ou mistos. Vários estudos sobre a susceptibilidade a antifúngicos de biofilmes contendo *C. albicans* formado em superfícies de resina acrílica têm demonstrado a resistência desta espécie a agentes sintéticos azólicos, antissépticos e polienos (CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2004; LAMFON et al., 2005).

Considerando as desvantagens associadas aos fármacos antifúngicos sintéticos como os efeitos tóxicos e colaterais, as interações medicamentosas, o desenvolvimento de resistência fúngica e a frequente ineficácia das terapias convencionais, as investigações sobre os agentes fitoterápicos com ação antimicrobiana foram intensificadas nas últimas décadas. Os agentes fitoterápicos são preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais, sendo, portanto, geralmente de menor custo em relação aos fármacos quimicamente sintetizados (VALERIO; GONZALES, 2005). No produto fitoterápico, diferentemente dos medicamentos alopáticos, não há a atuação isolada de um único princípio ativo, mas sim a de vários (fitocomplexo ou extrato bruto), resultando em uma ação menos intensa que aquela dos fármacos alopáticos convencionais, o que reduz ou até elimina seus efeitos indesejáveis (SANTOS et al., 2008).

Entre os extratos de plantas com ação contra *C. albicans* e potencial para o tratamento da estomatite protética (OTA et al., 2001; CASAROTO; LARA, 2010; MANSOURIAN et al., 2014; ALAVARCE et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; JABEUR et al., 2017), destaca-se aquele obtido das partes aéreas da espécie *E. giganteum.* Seu extrato hidroetanólico mostrou propriedades antiaderentes (ALAVARCE et al., 2015) e reduziu a biomassa e as células vivas em biofilmes de *C. albicans* (DA SILVA et al., 2017) formados em resina acrílica para base de prótese. Considerando esses efeitos, o presente estudo se propôs inicialmente avaliar a efetividade da incorporação do *E. giganteum* em materiais resilientes temporários para base de prótese sobre o biofilme de *C. albicans*.

A maior dificuldade encontrada nesta pesquisa relacionou-se justamente à incorporação do fitoterápico no interior da matriz polimérica dos materiais resilientes temporários. Os primeiros testes foram realizados segundo a metodologia utilizada por Bueno et al. (2015), que determinaram as CIMs para cinco fármacos (nistatina, clorexidina, cetoconazol, miconazol e itraconazol) incorporados aos materiais resilientes temporários Trusoft e Softone. Apesar de diversas tentativas, não foi observada a efetividade antifúngica com essa técnica de incorporação com o *E. giganteum* misturado a mesmos materiais. Mesmo aumentando a concentração do pó do fitoterápico e relação aos pós dos materiais tanto quanto possível, ou seja, de modo que não chegasse a interferir com a plastificação dos mesmos, não foi observada sua liberação a partir da matriz polimérica modificada, mesmo após 7 dias de incubação. Como ambos os materiais resilientes testados possuíam composições semelhantes (Softone e Trusoft), o mesmo protocolo foi testado em outros materiais utilizados para a mesma finalidade (Coe-Comfort e Coe-Soft), com o intuito de analisar se a partir de outra matriz polimérica ocorreria a liberação do *E. giganteum* incorporado. No entanto, mesmo após 7 dias de incubação e variando-se a concentração do fitoterápico, não foi observado qualquer efeito antifúngico além do verificado com os próprios materiais. Isso porque o Coe-Comfort e o Coe-Soft, que são condicionador de tecido e reembasador resiliente temporário, respectivamente, tais como o Softone e o Trusoft, apresentam um mínimo efeito antifúngico, mesmo sem adição de fitoterápico, provavelmente pela presença de um composto em sua formulação, como discutido posteriormente. Outro agravante referiu-se ao fato de o material Softone não ser mais importado para o Brasil. Assim, por uma questão de viabilidade de execução, associada a um efeito antifúngico que poderia ser potencializado pelo fitoterápico, optou-se por substituir os materiais resilientes temporários dos estudos prévios com fármacos sintéticos para Coe-Comfort e Coe-Soft, tendo assim, da mesma forma, um condicionador de tecido e um reembasador resiliente temporário provenientes de um mesmo fabricante. No entanto, ainda havia a problemática da liberação do *E. giganteum* a partir da matriz polimérica para se conseguir a efetividade desejada contra biofilme de *C. albicans*.

Os estudos anteriores disponíveis na literatura mostraram a efetividade do *E. giganteum* testado diretamente sobre o biofilme de *C. albicans* em resina acrílica (ALAVARCE et al., 2015; DA SILVA et al., 2017), mas não indiretamente partir da

liberação de uma matriz polimérica. Sabe-se que o nível de difusão dos agentes antimicrobianos pelos canais dos polímeros depende da temperatura e do meio, bem como do peso molecular, do tamanho e da forma de partícula e da distribuição e concentração do fármaco (BROOK; VAN NOORT, 1985; QUINN, 1985; URBAN et al., 2009). É conhecido que o nível de difusão das moléculas de um fármaco através de uma matriz polimerizada/plastificada é aumentado com a redução do peso molecular do mesmo (BROOK; VAN NOORT, 1985; MARK SALTZMAN et al., 1993). Sendo o peso molecular da nistatina (926,11 g/mol) superior aos pesos moleculares dos componentes presentes no extrato hidroetanólico do *E. giganteum*, os quais variam entre 100 e 700 g/mol e, considerando que as condições de meio de cultura e a temperatura utilizadas neste estudo para as amostras modificadas por esses fármacos foram idênticas, é possível supor que tais fatores não influenciaram na liberação do fitoterápico incorporado nos materiais resilientes temporários. Foi demonstrado que a nistatina apresenta uma distribuição uniforme de partículas com formas e tamanhos aleatórios e pequenos, variando de 10 a 50 µm (URBAN et al., 2015). Mesmo processando muito bem as amostras para a obtenção do pó do fitoterápico, suas partículas não se tornam tão reduzidas e homogêneas como a dos fármacos obtidos industrialmente. Assim, é provável que a morfologia e o tamanho das partículas do *E. giganteum,* bem como sua distribuição na matriz polimérica tenham impedido a liberação do fármaco na presente investigação. Estudos futuros sobre o padrão de incorporação desse agente natural adicionado aos materiais resiliente temporários são necessários para confirmar essa hipótese.

Diante do insucesso com a incorporação do *E. giganteum* às matrizes poliméricas testadas, foram iniciados os testes com o fitoterápico aplicado sobre a superfície dos materiais resilientes temporários. Para essa aplicação, o pó do fitoterápico deveria estar veiculado a algum componente que apresentasse compatibilidade com tais materiais. Por isso, o *E. giganteum* em pó passou a ser misturado a *primers* que são comercializados em alguns materiais resilientes temporários para a aplicação na superfície da resina acrílica para base de prótese antes da união com os mesmos durante o procedimento clínico de reembasamento. Assim, misturou-se assepticamente e em diversas concentrações o pó do extrato hidroetanólico do *E. giganteum* com diferentes *primers* antes da aplicação dessa mistura sobre os corpos de prova. Os *primers* testados foram aqueles provenientes

dos kits dos seguintes materiais resilientes temporários: Trusoft (reembasador) e Rite-Line (condicionado tecidual), pois são os comercialmente disponíveis que apresentam esse tipo de produto. Durante os testes com os *primers,* também foram utilizados os corpos de prova dos materiais Rite-Line e Trusoft, além de Coe-Comfort e Coe-Soft com o intuito de observar se o efeito antifúngico seria potencializado ao se usar produtos de um mesmo kit. Ainda, testou-se cada *primer* misturado ao fitoterápico nos diferentes materiais resilientes temporários supracitados para observar em qual situação a efetividade sobre o biofilme de *C. albicans* seria melhor. Em até 7 dias de incubação, observou-se um efeito inibitório do biofilme de *C. albicans* apenas quando o *E. giganteum* foi misturado ao primer do Rite-Line aplicado sobre Coe-Comfort e Coe-Soft em comparação ao efeito obtido apenas com a aplicação do mesmo primer sem o fitoterápico em ambos os materiais. Não foi observado efeito antifúngico relevante em relação aos controles com as demais combinações. Ainda assim, é válido ressaltar que a inibição fúngica observada com a aplicação superficial do *E. giganteum* apenas foi atingida quando se alterou a metodologia para a avaliação a efetividade do protocolo proposto, o que foi uma outra adequação metodológica necessária da presente investigação.

No estudo de Bueno et al. (2015), a efetividade da incorporação dos fármacos sintéticos aos materiais resilientes temporários, determinada a partir da obtenção das CIMs dos mesmos, foi avaliada pelo método do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT (2,3-Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl) -5- [(Phenyl-Amino)Carbonyl] - 2H-Tetrazolium Hydroxide - Sigma Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA) (CHANDRA et al., 2001; KUHN et al., 2003). Os sais de tetrazólio, de cor amarela, penetram rapidamente nas células intactas sendo convertidos, por ação enzimática em produtos de formazan, de cor laranja (KUHN et al., 2003). Esses produtos são solúveis em água, permitindo sua quantificação por espectrofotometria em sobrenadantes celulares. Quanto maior a atividade celular (viabilidade), maior a coloração e, consequentemente, o valor da absorbância (KUHN et al., 2003). O extrato hidroetanólico do *E. giganteum* apresenta uma coloração verde bem forte, o que interferiu negativamente com tal metodologia. O sobrenadante contendo os corpos de prova modificados com fitoterápico apresentavam alteração de cor, o que interferiu nas leituras do espectrofotômetro em comparação àquelas das amostras sem fitoterápicos. Para resolver o problema da interferência da cor do *E. giganteum*

com o métodos do XTT, foi realizada uma tentativa com o método de contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL), que é considerado padrão ouro nos estudos de microbiologia. Não foi adotado tal método no estudo de Bueno et al. (2015), pois houve inconsistência de resultados na incorporação de alguns fármacos nos materiais resilientes temporários testados. No entanto, ao utilizar na presente pesquisa o método de contagem de colônias viáveis, foram obtidos resultados com a aplicação do *primer* modificado pelo fitoterápico sobre as superfícies dos materiais resilientes temporários comparáveis aos da literatura e aos controles. Assim, este método ficou definido como sendo o utilizado para a avaliação da efetividade da ação do fitoterápico na superfície de materiais resilientes temporários sobre o biofilme de *C. albicans* bem como para determinação das CIMs dos agentes antimicrobianos testados.

A avaliação do biofilme de *Candida* spp. por meio quantificação de UFC/mL é uma metodologia frequentemente adotada para a investigação da ação antimicrobiana de fármacos, sendo considerada como o método padrão-ouro. (SENEVIRATNE et al., 2009; COSTA et al., 2011; ESTIVILL et al., 2011; PEREIRA et al., 2011). Por essa metodologia, é possível estimar o número de células microbianas viáveis, com base na sua capacidade de originar colônias sob condições específicas em determinado meio de cultura. Adota-se que cada colônia contabilizada foi originada por uma única célula microbiana viável e os resultados são expressos em UFC/mL. Uma desvantagem associada ao método é que todas as células viáveis são contadas, incluindo aquelas com baixa atividade metabólica. Por isso, seria interessante a avaliação complementar por um método que quantificasse a atividade metabólica do biofilme, como o XTT (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008), o que não foi possível pelos motivos supracitados. Além disso, há a limitação imposta pelo dimorfismo dos biofilmes de *C. albicans* (blastósporos, pseudohifas e hifas), o que resulta em uma variabilidade na quantificação entre amostras de um mesmo grupo. Por conseguinte, esta variabilidade pode representar um problema significativo no que diz respeito à reprodutibilidade da metodologia por meio da contagem de UFC/mL, especialmente para *C. albicans* (SENEVIRATNE et al., 2009; SRINIVASAN et al., 2011). Ainda, para que a contagem de UFC/mL fosse permitida no modelo experimental do presente estudo, fez-se necessária a raspagem mecânica do biofilme aderido sobre a superfície dos corpos de prova, o que pode ter

lesionado as células fúngicas. Dessa forma, resultados distintos podem ter sido obtidos em um mesmo grupo, seja experimental ou controle. Por fim, para se conhecer a condição geral do biofilme, nesta investigação foi proposto inicialmente o ensaio de biomassa total por meio da coloração com cristal violeta. Neste método, há a quantificação da matriz tanto de células vivas quanto de células mortas do biofilme (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). No entanto, sua realização depende de um processo de descoloração do sobrenadante após coloração das amostras com cristal violeta. Em tal processo, neste estudo, houve liberação dos pigmentos do fitoterápico para o sobrenadante o que também interferiu com a absorbância da solução em espectrofotômetro para as amostras modificadas em relação àquelas controles, alterando a confiabilidade do método e, portanto, inviabilizando sua utilização para complementação das análises dos resultados .

No presente estudo, foi considerada como CIM a ser misturada ao *primer,* a concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento fúngico ao longo do período de avaliação (14 dias) em porcentagens iguais ou maiores que 90%. Tal padrão foi selecionado porque concentrações superiores às essas CIMs para os fármacos testados não foram capazes de aumentar a porcentagem de inibição fúngica. As concentrações do fitoterápico e da nistatina foram testadas por tentativas variando-se de 0,016 a 0,358g (grama pó de antimicrobiano por mililitro de *primer*) (CHANDRA et al., 2001). As $CIMs_{90}$ obtidas para cada fármaco (*E. giganteum*= 0,100 g/mL e nistatina= 0,016 g/mL) não variaram em função do material resiliente temporário nem da cepa de *Candida* bem como não interferiram com a manipulação nem com a secagem do *primer*. A referência de CIM utilizada na presente investigação (CIM_{90}) corrobora com estudos prévios que a consideram como efetiva para a validação de um método de inibição de crescimento microbiano (WASTESON; HOIE; ROBERTS, 1994; ISHAM; GHANNOUM, 2006; AMRAN et al., 2011).

Nesta investigação, como o *primer* sem fármaco (controle) não foi eficiente em reduzir os valores de UFC/mL em comparação aos demais tratamentos, exceto por uma mínima inibição fúngica em 24 h para a cepa ATCC em ambos os materiais, a análise estatística dos resultados foi realizada a partir das porcentagens de inibição do biofilme fúngico pelos fármacos em comparação ao controle. Tais porcentagens variaram apenas de acordo com o fármaco e tempo de incubação, não

havendo diferença estatisticamente significante entre os materiais e as cepas de *C. albicans.* Esperava-se que a inibição fúngica para a cepa SC fosse menor em razão de sua maior capacidade de formar biofilmes em relação à cepa ATCC (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007). Da mesma forma, era esperada uma maior inibição do biofilme fúngico para o condicionador tecidual Coe-Comfort em relação ao reembasador temporário Coe-Soft pela potencialização do efeito dos fármacos em sua superfície resultante da ação antifúngica de um principio ativo (undecilenato de zinco) presente em maior quantidade no primeiro material. Segundo o MSDS (Material Safety Data Sheet), o pó do Coe-Comfort é constituído exclusivamente por undecilenato de zinco, ao passo que o do Coe-Soft contém, além desse composto, uma alta porcentagem (mais de 60%) de polietil metacrilato. Apesar das porcentagens médias de inibição em algumas condições experimentais serem menores para a cepa SC em relação à ATCC e para o Coe-Soft em relação ao Coe-Comfort, considerando um mesmo fármaco e um período de incubação, não houve diferença estatisticamente significante entre tais fatores. Por conseguinte, os resultados serão discutidos com base apenas nos fatores que alteraram a inibição do biofilme fúngico, ou seja, o tratamento superficial com os diferentes fármacos (*E. giganteum* e nistatina) em função dos três períodos de incubação avaliados (24 h, 7 e 14 dias).

Os resultados evidenciaram uma progressiva inibição percentual do biofilme fúngico nas amostras modificadas superficialmente pelo *E. giganteum* ao longo da vida útil dos materiais resilientes temporários testados (14 dias). A porcentagem média de inibição do biofilme de *C. albicans* foi de 85,90% em 24 h de incubação, com aumento para 93,85% aos 7 dias, sendo atingido em 14 dias valores estatisticamente semelhantes aos obtidos com a nistatina (97,03%). Esses achados favoráveis podem ser atribuídos à ação antimicrobiana de alguns de seus compostos.

Vários princípios ativos estão presentes nas partes aéreas da espécie *E. giganteum,* incluindo sais minerais (ácido silício, ácido aquisético, ácido málico, ácido oxálico, ácido ascórbico, acilglicérideos de ácido esteárico, oleico, linoleico e linolênico) (LORENZI; DE ABREU MATOS, 2002), compostos fenólicos derivados do ácido cafeico, ácido ferúlico (ALAVARCE et al., 2015), ácido clorogênico e tartárico, alcaloides (piridinicos, nicotina e palustrina) e, principalmente, flavonoides

glicosilados da apigenina, quercetina e do campferol (LORENZI; DE ABREU MATOS, 2002), derivados das estirilpironas e do ácido hidroxicinâmico (FRANCESCATO et al., 2013). Destes, destacam-se os flavonoides, um grupo de metabólitos secundários de plantas amplamente distribuído no reino vegetal, presente de forma comum em frutas, vegetais e algumas bebidas (CALDERON-MONTANO et al., 2011). Os flavonoides apresentam substâncias fenolíticas hidroxiladas e são conhecidos por serem sintetizados pelas plantas em resposta à infecção microbiana. São reconhecidos por sua eficácia medicinal como agentes antivirais, antibacterianos, anti-inflamatórios, anticâncer e hepatoprotetores (KUMAR; PANDEY, 2013a). Um dos grandes benefícios à saúde associados ao consumo de flavonoides refere-se às suas atividades antioxidantes, que são moduladas pelos grupos funcionais hidroxila e ocorrem por meio da eliminação dos radicais livres e/ou capacidade de quelação de íons metálicos (KUMAR; PANDEY, 2013b). Assim, tais efeitos são influenciados substancialmente pelo grau de polimerizaçao, pela configuração, pela substituição e pelo número total de grupos hidroxila do composto. A quelação dos metais pode ser crucial na prevenção do estresse oxidativo, ou seja, da geração de radicais livres que prejudicam importantes biomoléculas (LEOPOLDINI et al., 2006).

Franscecato et al. (2013) observaram que os derivados de campferol foram os flavonoides mais abundantemente encontrados no *E. giganteum*, sendo seus níveis pelo menos dez vezes mais elevados que aqueles observados para quercetina. Estudos epidemiológicos encontraram uma associação positiva entre o consumo de alimentos contendo campferol e um risco reduzido de desenvolver doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (HERTOG et al., 1993; GATES et al., 2007; LIN et al., 2007; CUI et al., 2008). Esse flavonoide tem sido apontado em estudos in vitro e in vivo em animais como um potencial agente na prevenção e/ou tratamento destas e outras doenças, tais como doenças neurodegenerativas e infecciosas, diabetes, osteoporose, ansiedade, alergias, inflamações e dor (SAMHAN-ARIAS; MARTIN-ROMERO; GUTIERREZ-MERINO, 2004; SONG et al., 2005; MALEKI-DIZAJI; FATHIAZAD; GARJANI, 2007; YORDANOV et al., 2008; AGUIRRE-HERNANDEZ et al., 2010). Além disso, são amplamente relatadas as atividades antibacterianas (XU; LEE, 2001; OTSUKA et al., 2008; HABBU et al., 2009), antivirais (MAHMOOD et al., 1996; MITROCOTSA et al., 2000; JEONG et al.,

2009), antifúngicas (HWANG et al., 2001; YORDANOV et al., 2008; BRUNSKOLE et al., 2009) e antiprotozoárias (CALZADA; MECKES; CEDILLO-RIVERA, 1999; BARBOSA; CALZADA; CAMPOS, 2007) do campferol, seus glicosídeos ou as plantas que o contém.

Os flavonoides podem apresentar múltiplos alvos celulares e não apenas um site específico de ação (COWAN, 1999). A sua atividade é provavelmente devido à sua capacidade de formar complexos com proteínas extracelulares e solúveis bem como com paredes celulares microbianas. Os flavonoides mais lipofílicos também podem romper as membranas celulares dos micro-organismos (SATO et al., 1996). A formação de complexos com proteínas ocorre tanto por meio de forças inespecíficas, como ligações de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos, quanto por ligações covalentes (COWAN, 1999). Dessa forma, sua ação antimicrobiana pode estar associada à sua capacidade de inativar as adesinas microbianas, enzimas, proteínas de transporte de envelope celular, entre outras (COWAN, 1999; YORDANOV et al., 2008; KUMAR; PANDEY, 2013b). A inativação de adesinas pelos flavonoides impede ou minimiza a adesão das células fúngicas sobre o substrato para indução da formação do biofilme. Ainda, é possível que esses compostos alterem a permeabilidade da membrana das células fúngicas por meio da inativação de certas proteínas carreadoras (COWAN, 1999; YORDANOV et al., 2008; KUMAR; PANDEY, 2013b). A delimitação do possível mecanismo de ação antimicrobiana de flavonas e flavonoides é dificultada por achados conflitantes Os flavonoides que não possuem grupos hidroxila nos seus anéis β são mais ativos contra micro-organismos em relação àqueles com os grupos OH, sugerindo que seu alvo microbiano é a membrana celular (CHABOT et al., 1992) atingindo, sobretudo, os compostos lipofílicos dessa estrutura. No entanto, o efeito oposto também tem sido sugerido, ou seja, quanto mais hidroxilação (acréscimo ou substituição de hidroxila em uma molécula), maior atividade antimicrobiana (SATO et al., 1996). E não há uma previsibilidade clara do grau de hidroxilação e toxicidade para os micro-organismos (COWAN, 1999).

Tem sido demonstrado que o campferol interfere com enzimas vitais para o crescimento e virulência de certos fungos. A enzima quitina sintase é responsável pela síntese de quitina, um polissacarídeo estrutural vital para as paredes celulares fúngicas. Já a melanina é um fator de virulência em fungos patogênicos, sendo

conhecido alvo para fármacos antifúngicos. O campferol mostrou ser capaz de inibir a síntese de melanina (BRUNSKOLE et al., 2009) e quitina sintase II, prevenindo a divisão de células fúngicas (HWANG et al., 2001). Yordanov et al. (2008) encontraram que os flavonoides apigenina e campferol, ambos presentes no *E. giganteum*, afetaram enzimas extracelulares de *C. albicans,* que são consideradas como os fatores de virulência responsáveis pela penetração do fungo nas células hospedeiras (YORDANOV et al., 2008). Além disso, o campferol aumentou o número de ratos sobreviventes quando aplicado em um modelo animal experimental de infecção sistêmica de *C. albicans.* A aplicação de apigenina e campferol no modelo animal de infecção cutânea do mesmo fungo também se mostrou eficiente em suprimir os sintomas, além de eliminar de forma acelerada a levedura no local de inoculação (YORDANOV et al., 2008). Considerando os aspectos anteriores, os resultados favoráveis obtidos com o *E. giganteum* para a inibição do biofilme de *C. albicans* formado sobre os materiais resilientes temporários ao longo de sua vida útil podem ser atribuídos, ao menos em parte, à ação antifúngica dos flavonoides glicosados presentes neste fitoterápico. Como mencionado previamente, a vantagem de se testar um produto fitoterápico (fitocomplexo ou extrato bruto) como realizado nesta investigação, é que não há a ação isolada de um único princípio ativo, reduzindo ou até eliminando seus efeitos adversos (SILVA et al., 2012). Além disso, é possível dizer, com base em um estudo piloto, que a ação combinada de vários princípios ativos pode potencializar o efeito antimicrobiano de um agente fitoterápico. Em um ensaio in vitro paralelo, um princípio ativo isolado da *Punica* (romã) processado industrialmente, denominado *Punicalagin* (CAS Number 65995-63-3, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bem como o extrato hidroetanólico bruto da *Punica granatum* foram testados nas mesmas condições que o *E. giganteum* neste estudo. No entanto, nenhum efeito inibitório contra o biofilme de *C. albicans* para ambos os materiais e cepas foi obtido quando o principio isolado foi aplicado superficialmente após mistura ao *primer*. Já o extrato da *P. granatum* resultou em inibição fúngica semelhante à obtida com o extrato do *E. giganteum* ao longo do período de incubação. Assim, é possível supor que efeito antifúngico do fármaco fitoterápico depende de vários e não de apenas um princípio ativo.

Os antifúngicos da classe dos polienos, como a nistatina, possuem um amplo espectro de ação, podendo ser fungicidas e fungistáticos e, por serem tóxicos, seu

uso foi restringido à administração tópica. O efeito inibitório da nistatina é resultado da interação de seus polienos com os esteróides da membrana plasmática do fungo, em especial o ergosterol. Isso leva à formação de poros ou canais na membrana que ocasionam a liberação de potássio e de outros componentes citoplasmáticos, causando a morte celular (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998; ANDRIOLE, 2000; ROGERS, 2002). Uma explicação possível para o desenvolvimento de resistência aos polienos é uma menor quantidade de ergosterol na membrana celular, mas os mecanismos genéticos envolvidos nesse processo ainda não são totalmente definidos (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998; ANDRIOLE, 2000; ROGERS, 2002). Apesar da menor eficácia da nistatina em suspensão oral para o tratamento de candidose bucal ou orofaríngea em bebês, crianças e pacientes com HIV/AIDS (FLYNN et al., 1995; PONS et al., 1997; GOINS et al., 2002), este fármaco é ainda considerado o agente de primeira escolha para o tratamento tópico de casos não complicados (AKPAN; MORGAN, 2002; THOMPSON et al., 2010; IQBAL; ZAFAR, 2016; LYU et al., 2016) e em pacientes com função imunológica normal (PATIL et al., 2015). Agentes polienos como a nistatina resultam em poucos efeitos colaterais, e, quando em suspensão, possuem baixa absorção no trato gastrointestinal (AZIZI et al., 2016; FABIO et al., 2016). Portanto, a maioria do antifúngico é excretada sem sofrer qualquer alteração (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014), reduzindo assim seu potencial hepatotóxico (GOINS et al., 2002). Em 2016, a Infectious Diseases Society of America atualizou suas diretrizes de prática clínica para a gestão da candidose, recomendando a suspensão ou pastilhas de nistatina para os casos de infecção orofaríngea leve (PAPPAS et al., 2016). Em ensaios clínicos randomizados de tratamento de pacientes com estomatite protética, a suspensão oral de nistatina foi tão eficaz quanto a terapia fotodinâmica (MIMA et al., 2012) ou a desinfecção semanal das próteses totais em micro-ondas (SANITA et al., 2012; SILVA et al., 2012). A menor detecção de cepas fúngicas resistentes à nistatina e seu acessível custo são outras vantagens desse fármaco se comparado a outros antifúngicos (GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008). A dosagem de nistatina recomendada para adultos é de 400.000 a 600.000 U, quatro vezes ao dia. Além disso, não há relatos de efeitos tóxicos graves ou superinfecções mesmo frente a excesso de doses diárias orais de nistatina (5.000.000 U). A dose letal mediana (DL_{50}) desse fármaco quando aplicada por via intraperitoneal em

camundongos é de 200 mg/kg. A CIM de nistatina adicionada ao reembasador resiliente deste estudo é muito inferior à dose que poderia causar toxicidade aguda por esse fármaco, mesmo se administrada de uma única vez (WINDHOLZ et al., 1983) e não gradualmente como proposto por esta metodologia. Por todos esses fatores, a nistatina foi selecionada no presente investigação para efeito comparativo com o *E. giganteum* na análise da efetividade de inibição do biofilme fúngico formado sobre materiais resilientes temporários. Os resultados confirmaram o efeito fungicida da nistatina ao longo dos 14 das de avaliação com porcentagens médias de inibição do biofilme fúngico próximas ou iguais a 100%. O efeito inibitório da nistatina é resultado da interação de seus polienos com o ergosterol (análogo ao colesterol das membranas das células humanas), que é o esterol predominante nas membranas plasmáticas dos fungos (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998). Esta molécula contribui para diversas funções celulares, sendo importante para a integridade da membrana, permitindo que muitas das enzimas presentes nessa estrutura possam exercer adequadamente a sua função, incluindo a síntese de quitina, importante para a divisão e crescimento celular (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998; ANDRIOLE, 2000). A morte celular pela interação dos polienos com o ergosterol também pode ser resultante do aumento da permeabilidade da membrana e consequente perda de potássio e de outros componentes citoplasmáticos (ROGERS, 2002).

Os resultados do presente estudo sugeriram que a aplicação do fitoterápico nos materiais macios por meio do *primer* testado permitiu sua liberação gradual e sempre dentro da CIM desejada, uma vez que as porcentagens iniciais próximas a 90% de inibição do biofilme fúngico obtidas com o *E. giganteum* foram progressivamente aumentadas ao longo dos 14 dias de incubação. Tais achados reforçam de forma positiva a terapia com sistema de liberação gradual de fármacos em comparação à terapia convencional com antifúngicos para o tratamento da estomatite protética. Com a liberação gradativa do fármaco, é possível manter uma concentração terapêutica na mucosa infectada e região interna da prótese pelo período correspondente à vida útil de um material resiliente temporário para prótese (SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994; MATSUURA et al., 1997; NEPPELENBROEK et al., 2008; LIMA et al., 2016a, NEPPELENBROEK et al., 2017), o qual é também equivalente ao tempo médio utilizado para o tratamento

convencional para estomatite protética com nistatina tópica (WEBB et al., 1998; BANTING; HILL, 2001; SANITA et al., 2011; MIMA et al., 2012; SILVA et al., 2012), ou seja, 14 dias. Ao mesmo tempo, o revestimento da superfície interna da prótese pelo material superficialmente modificado pelo fármaco elimina o trauma resultante do biofilme e da eventual falta de adaptação da área basal, prevenindo ainda a aderência microbiana e restabelecendo o conforto ao paciente (HOLMBERG, 1980; MEDEIROS; PACHECO, 2000; MARÍN ZULUAGA; GOMEZ VELANDIA; RUEDA CLAUIJO, 2011).

Pelos resultados encontrados neste estudo, é possível sugerir que o *primer* do condicionador Rite-Line foi eficiente em manter os fármacos nas superfícies dos materiais resilientes temporários durante os 14 dias de avaliação. Entretanto, não há qualquer informação no MSDS nem o fabricante descreve sobre a composição deste produto utilizado para a mistura com os fármacos desta investigação. Da mesma forma, não foram encontrados estudos prévios que tenham utilizado qualquer produto do kit do condicionador tecidual Rite-Line (pó, líquido ou *primer*). Por fim, na sua bula, são descritos unicamente os passos para a utilização de seus produtos, não havendo qualquer informação sobre composição. Embora não seja fornecida a composição do *primer*, o fabricante descreve que o líquido do Rite-Line é composto basicamente (<80%) de um plastificante de dialquil ftalato, mas sem especificações do seu tipo. Outros componentes como metil metacrilato (<20%) e toluidina (<5%) também estão descritos na formulação do líquido, não sendo notificada a presença de álcool etílico. Por essa razão, é possível que o *primer* desse material tenha algum solvente ou monômero em sua composição com o intuito de aumentar a adesão à resina acrílica para base de prótese. Pelo MSDS, nota-se que a maioria dos *primers* que acompanham os kits de pó e líquido dos materiais reembasadores para base de prótese é constituída exclusivamente por monômeros e/ou solventes. Como também não foram encontrados achados na literatura disponível acerca da aplicação de fármacos misturados a *primers* sobre materiais resilientes temporários, apenas comparações indiretas com tais produtos em polímeros de forma geral serão possíveis de serem estabelecidas para explicar os resultados desta investigação. Segundo Arima et al. (1996), os adesivos que possuem solventes podem dissolver a superfície da resina acrílica para de base de prótese e promover a interpenetração da resina de reembasamento. Tal essa reação pode resultar na formação de uma

camada mista de resina de base e de reembasamento. Já os adesivos que contêm monômeros de metacrilato em sua composição possuem baixa capacidade para dissolver a superfície da resina de base. Contudo, o monômero difunde-se na resina de base, polimerizando-se simultaneamente com a resina reembasadora (ARIMA; MURATA; HAMADA, 1996). Como o *primer* do Rite-Line neste estudo não foi colocado entre a resina de base e a resina reembasadora, estando esta última plastificada quando de sua aplicação, é mais provável que a ação de penetrabilidade tenha ocorrido por meio do (s) solvente (s) de sua composição. Assim, é possível que o tratamento com o *primer* associado aos fármacos tenha resultado em alteração superficial dos materiais resilientes temporários levando a uma maior penetração dos agentes antimicrobianos para os poros e canaletas criados pela dissolução causada pela ação do (s) solvente (s) de sua composição (ARIMA; MURATA; HAMADA, 1996). Esse mecanismo foi suficiente para alimentar o sistema de liberação gradual dos fármacos em concentrações inibitórias desejáveis de nistatina e *E. giganteum* para o biofilme de *C. albicans* durante 14 dias.

Há uma dificuldade em manter as concentrações efetivas de antifúngicos tópicos convencionais nas superfícies internas das próteses e tecidos infectados devido ao fluxo salivar, aos movimentos da língua e da deglutição (BANTING; HILL, 2001; MIMA et al., 2012). Ainda, a presença de um biofilme complexo nas bases acrílicas impedem a manutenção de níveis terapêuticos dos agentes antifúngicos tópicos e sistêmicos nesses locais, conduzindo assim à reinfecção da mucosa por meio das próteses infectadas (DAVENPORT, 1972; CHAU et al., 1995; MATHABA; DAVIES; WARMINGTON, 1995; SATO et al., 1997; PEREIRA et al., 2011; SALERNO et al., 2011). Por fim, tratamentos com antifúngicos convencionais possuem rigorosa administração e posologia, o que leva, muitas vezes, o paciente a descontinuar seu uso (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994; RADNAI et al., 2010). O grande diferencial de um sistema de liberação gradual de um fármaco em comparação a terapia convencional com antifúngicos para o tratamento da estomatite protética é a possibilidade de manter uma dosagem terapêutica do fármaco nos tecidos protéticos e paraprotéticos e superfícies acrílicas por um determinado período, praticamente eliminando a necessidade de participação do paciente (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994; RYALAT; DARWISH; AMIN, 2011). No caso da utilização de fármacos naturais, as vantagens são ainda maiores em

comparação aos fármacos sintetizados quimicamente, em razão do aparecimento frequente de resistência microbiana pelo seu uso indiscriminado (ROGERS, 2002). Além disso, os efeitos causados pelos medicamentos alopáticos, ainda que minimizados pela liberação gradual e direta para o sítio da infecção (ADDY, 1981; PATEL et al., 2001; GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008; AMIN et al., 2009; SALIM et al., 2012a), podem ser de ordem sistêmica e de toxicidade ou, até mesmo, de interações fármaco-fármaco como já comentado. (LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993; ROGERS, 2002; CASALINUOVO; DI FRANCESCO; GARACI, 2004). Considerando o potencial de liberação lenta e gradual do *E. giganteum* verificado com as porcentagens de inibição progressivas obtidas neste estudo ao longo de 14 dias, sugere-se o tratamento superficial dos materiais resilientes temporários para base de prótese com esse fitoterápico para futuras investigações como uma alternativa ao tratamento convencional para a estomatite protética.

As limitações do presente estudo incluem que fatores clínicos como o ambiente bucal e a conformação da base da prótese não foram considerados na metodologia. O biofilme protético é altamente complexo e contêm inúmeras outras espécies microbianas que não foram testadas nesta metodologia. Além disso, apenas uma marca comercial de cada tipo de material (condicionador de tecido e reembasador resiliente temporário) foi avaliada, não podendo, dessa forma, estender os resultados a outras marcas. O extrato do *E. giganteum* foi testado na sua forma bruta, sendo necessárias pesquisas futuras para conhecer qual ou quais componentes apresentaram a ação antifúngica observada. Além disso, para indicar a aplicação do *E. giganteum* nos materiais resilientes temporários para base de próteses, são necessários estudos in vitro para avaliação do efeito deste protocolo sobre suas propriedades fundamentais como sorção de água e solubilidade, morfologia superficial, resistência ao descolamento da base da prótese, deformação permanente, dureza Shore A e resistência ao rasgamento. Métodos adicionais para avaliação do biofilme após o tratamento proposto como os colorimétricos do ensaio de redução de sais de tetrazólio- XTT e do ensaio de biomassa total por meio da coloração com cristal violeta não puderam ser utilizados pela interferência da cor liberada pelos componentes do *E. giganteum*. Durante seu uso na cavidade bucal, os materiais resilientes temporários podem sofrer estresses adicionais como alterações térmicas, variações de pH e deformação pela carga oclusal.

Dessa forma, uma avaliação final do tratamento para estomatite protética com materiais resilientes temporários modificados superficialmente por *E. giganteum* somente poderia ser determinada por meio de estudos clínicos em pacientes.

4 CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos e considerando as limitações deste estudo in vitro, foi possível concluir que:

- ✓ A aplicação da CIM (0,100 g/mL) de extrato hidroetanólico de *E. giganteum* misturado ao *primer* na superfície do condicionador tecidual e reembasador resiliente temporário testados se mostrou efetiva na inibição do biofilme fúngico em comparação à aplicação do *primer* apenas; este resultado não variou significativamente em função do tipo de material resiliente temporário ou cepa de *C. albicans* testada (SC 5314 e ATCC 90028);

- ✓ A liberação do *E. giganteum* a partir da superfície dos materiais resilientes temporários se apresentou de forma gradual, o que permitiu que as elevadas porcentagens de inibição fúngica iniciais (próximas a 90%) fossem ainda progressivamente aumentadas ao longo do tempo, resultando, ao final de 14 dias, em níveis de eficácia estatisticamente semelhantes aos obtidos com a nistatina;

- ✓ A possibilidade de utilizar o *E. giganteum* de maneira similar à nistatina em um sistema de liberação controlada aplicável a materiais para base de próteses reforça a necessidade de estudos futuros sobre a avaliação da efetividade deste protocolo como alternativa a terapias convencionais com fármacos alopáticos em pacientes com estomatite protética.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Addy M. In vitro studies into the use of denture base and soft liner materials as carriers for drugs in the mouth. J Oral Rehabil. 1981 8(2):131-42.

Addy M, Handley R. The effects of the incorporation of chlorhexidine acetate on some physical properties of polymerized and plasticized acrylics. J Oral Rehabil. 1981 Mar;8(2):155-63.

Aguirre-Hernandez E, Gonzalez-Trujano ME, Martinez AL, Moreno J, Kite G, Terrazas T, et al. HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from Tilia americana var. mexicana. J Ethnopharmacol. 2010 Jan 08;127(1):91-7.

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

Alavarce RA, Saldanha LL, Almeida NL, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. The Beneficial Effect of Equisetum giganteum L. against Candida Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis. Evid Based Complement Alternat Med. eCAM: 2015 2015(939625).

Alcântara CS, de Macedo AF, Gurgel BC, Jorge JH, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel bond strength of resilient liner modified by the addition of antimicrobial agents to denture base acrylic resin. J Appl Oral Sci. 2012 Nov-Dec;20(6):607-12.

Amin WM, Al-Ali MH, Salim NA, Al-Tarawneh SK. A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis. Eur J Dent. 2009 Oct;3(4):257-66.

Amran F, Aziz MN, Ibrahim HM, Atiqah NH, Parameswari S, Hafiza MR, et al. In vitro antifungal susceptibilities of Candida isolates from patients with invasive candidiasis in Kuala Lumpur Hospital, Malaysia. J Med Microbiol. 2011 Sep;60(Pt 9):1312-6.

Andriole VT. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. Int J Antimicrob Agents. 2000 Nov;16(3):317-21.

Aoun G, Berberi A. Prevalence of Chronic Erythematous Candidiasis in Lebanese Denture Wearers: a Clinico-microbiological Study. Mater Sociomed. 2017 Mar;29(1):26-9.

Aoun G, Cassia A. Evaluation of Denture-Related Factors Predisposing to Denture Stomatitis in a Lebanese Population. Mater Sociomed. 2016 Oct;28(5):392-6.

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

Arevalo MP, Arias A, Andreu A, Rodriguez C, Sierra A. Fluconazole, itraconazole and ketoconazole in vitro activity against Candida spp. J Chemother. 1994 Aug;6(4):226-9.

Arima T, Murata H, Hamada T. The effects of cross-linking agents on the water sorption and solubility characteristics of denture base resin. J Oral Rehabil. 1996 Jul;23(7):476-80.

Azizi A, Amirzadeh Z, Rezai M, Lawaf S, Rahimi A. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on Candida albicans. J Photochem Photobiol B. 2016 May;158:267-73.

Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005 10(Suppl 1):E27-39.

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

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

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

Barbosa E, Calzada F, Campos R. In vivo antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. J Ethnopharmacol. 2007 Feb 12;109(3):552-4.

Barnabé W, de Mendonca Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, Streptococcus mutans and Candida albicans. J Oral Rehabil. 2004 May;31(5):453-9

Bergendal T, Isacsson G. Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. Scand J Dent Res. 1980 Oct;88(5):446-54.

Bilhan H, Sulun T, Erkose G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O, et al. The role of Candida albicans hyphae and Lactobacillus in denture-related stomatitis. Clin Oral Investig. 2009 Dec;13(4):363-8.

Boscato N, Radavelli A, Faccio D, Loguercio AD. Biofilm formation of Candida albicans on the surface of a soft denture-lining material. Gerodontology. 2009 Sep;26(3):210-3.

Brook IM, van Noort R. Drug release from acrylic polymers via channels and cracks: in vitro studies with hydrocortisone. Biomaterials. 1985 Jul;6(4):281-5.

Brown D. Resilient soft liners and tissue conditioners. Br Dent J. 1988 Jun 11;164(11):357-60.

Brunskole M, Zorko K, Kerbler V, Martens S, Stojan J, Gobec S, et al. Trihydroxynaphthalene reductase of Curvularia lunata--a target for flavonoid action? Chem Biol Interact. 2009 Mar 16;178(1-3):259-67.

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

Budtz-Jorgensen E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. Acta Odontol Scand. 1990 Feb;48(1):37-43.

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

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

Bueno M, Urban V, Barberio G, da Silva W, Porto V, Pinto L, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the Candida albicans biofilm. Oral Dis. 2015 Jan;21(1):57-65.

Bueno MG, Sousa EJB, Hotta J, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Surface Properties of Temporary Soft Liners Modified by Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungals. Braz Dent J. 2017 Jan-Apr;28(2):158-64.

Bulad K, Taylor RL, Verran J, McCord JF. Colonization and penetration of denture soft lining materials by Candida albicans. Dent Mater. 2004 Feb;20(2):167-75.

Caceres A, Giron LM, Martinez AM. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. J Ethnopharmacol. 1987 May;19(3):233-45. Chabot, S., R. Bel-Rhlid, R. Chenevert, and Y. Piche. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, Gigaspora margarita Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds

under CO2-enriched conditions. New Phytol. 1992 Apr;10 (122):461–467.

Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Lopez-Lazaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. Mini Rev Med Chem. 2011 Apr;11(4):298-344.

Calzada F, Meckes M, Cedillo-Rivera R. Antiamoebic and antigiardial activity of plant flavonoids. Planta Med. 1999 Feb;65(1):78-80.

Campanha NH, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE, Machado AL, Giampaolo ET. The effect of long-term disinfection procedures on hardness property of resin denture teeth. Gerodontology. 2012 Jun;29(2):e571-6.

Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. J Prosthet Dent. 2005 May;93(5):483-7.

Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2008 Oct;23(5):419-24.

Capistrano HM, de Assis EM, Leal RM, Alvarez-Leite ME, Brener S, Bastos EM. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of Candida-associated denture stomatitis. Evid Based Complement Alternat Med; eCAM. 2013 2013(947980).

Carneiro DM, Freire RC, Honorio TC, Zoghaib I, Cardoso FF, Tresvenzol LM, et al. Randomized, Double-Blind Clinical Trial to Assess the Acute Diuretic Effect of Equisetum arvense (Field Horsetail) in Healthy Volunteers. Evid Based Complement Alternat Med: eCAM. 2014 2014(760683).

Carter GM, Kerr MA, Shepherd MG. The rational management of oral candidosis associated with dentures. N Z Dent J. 1986 Jul;82(369):81-4.

Casalinuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in Candida albicans: a review of mechanisms. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2004 Mar-Apr;8(2):69-77.

Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis. Fitoterapia. 2010 Jul;81(5):323-8.

Chan CK, DiMagno TJ, Chen LX, Norris JR, Fleming GR. Mechanism of the initial charge separation in bacterial photosynthetic reaction centers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Dec 15;88(24):11202-6.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001 Mar;80(3):903-8.

Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. J Prosthet Dent. 1995 Sep;74(3):309-13.

Choi Y, Lee U, Lee B, Lee M. Pharmacokinetic interaction between itraconazole and metformin in rats: Competitive inhibition of metabolism of each drug by each other via hepatic and intestinal CYP3A1/2. Br J Pharmacol. 2010 161(4):815-29.

Chopde N, Pharande A, Khade MN, Khadtare YR, Shah SS, Apratim A. In vitro antifungal activity of two tissue conditioners combined with nystatin, miconazole and fluconazole against Candida albicans. J Contemp Dent Pract. 2012 Sep-Oct;13(5):695-8.

Coelho CM, Sousa YT, Dare AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. J Oral Rehabil. 2004 Feb;31(2):135-9.

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

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

Cui Y, Morgenstern H, Greenland S, Tashkin DP, Mao JT, Cai L, et al. Dietary flavonoid intake and lung cancer--a population-based case-control study. Cancer. 2008 May 15;112(10):2241-8.

da Silva RA, Bernardo LP, Moreno JML, Lara VS, Porto VC. Equisetum giganteum influences the ability of Candida albicans in forming biofilms over the denture acrylic resin surface. Pharm Biol. 2017 Dec;55(1):1698-702.

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

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

Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. J Prosthet Dent. 1988 Oct;60(4):467-70.

Dixon DL, Breeding LC, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with Candida albicans. J Prosthet Dent. 1999 Feb;81(2):207-14.

Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. Candida-associated denture stomatitis. Folia Microbiol (Praha). 2001 46(5):443-6.

Dorocka-Bobkowska B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B, Hedzelek W, Szumala-Kakol A, Budtz-Jorgensen E. Candida-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract. 2010 Oct;90(1):81-6.

Douglas WH, Walker DM. Nystatin in denture liners--an alternative treatment of denture stomatitis. Br Dent J. 1973 Jul 17;135(2):55-9.

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

Fabio CA, Yolanda MB, Carmen GM, Francisco C, Antonio Julian B, Leonor PL, et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivacion of Candida albicans in a murine model. J Oral Pathol Med. 2016 Sep;45(8):627-33.

Falah-Tafti A, Jafari AA, Lotfi-Kamran MH, Fallahzadeh H, Hayan RS. A Comparison of the Efficacy of Nystatin and Fluconazole Incorporated into Tissue Conditioner on the in vitro Attachment and Colonization of Candida Albicans. Dent Res J (Isfahan) 2010 7(1):18-22.

Farinon M, Lora PS, Francescato LN, Bassani VL, Henriques AT, Xavier RM, et al. Effect of Aqueous Extract of Giant Horsetail (Equisetum giganteum L.) in Antigen-Induced Arthritis. Open Rheumatol J. 2013 Dec 30;7:129-33.

Farrell DJ. Tissue conditioning and tissue conditioners. Dent Clin North Am. 1975 Apr;19(2):255-68.

Ferreira MA, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-Garcia RC, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with Candida species. Clin Oral Investig. 2009 Jun;13(2):237-42.

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

Flynn PM, Cunningham CK, Kerkering T, San Jorge AR, Peters VB, Pitel PA, et al. Oropharyngeal candidiasis in immunocompromised children: a randomized, multicenter study of orally administered fluconazole suspension versus nystatin. The Multicenter Fluconazole Study Group. J Pediatr. 1995 Aug;127(2):322-8.

Francescato LN, Debenedetti SL, Schwanz TG, Bassani VL, Henriques AT. Identification of phenolic compounds in Equisetum giganteum by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. Talanta. 2013 Feb 15;105(192-203.

Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira EFE. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. J Oral Rehabil. 2008 May;35(5):370-4.

Garcia-Cuesta C, Sarrion-Perez MG, Bagan JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. J Clin Exp Dent. 2014 Dec;6(5):e576-82.

Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. Int J Cancer. 2007 Nov 15;121(10):2225-32.

Geerts GA, Stuhlinger ME, Basson NJ. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. J Oral Rehabil. 2008 Sep;35(9):664-9.

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

Giannini PJ, Shetty KV. Diagnosis and management of oral candidiasis. Otolaryngol Clin North Am. 2011 Feb;44(1):231-40, vii.

Goins RA, Ascher D, Waecker N, Arnold J, Moorefield E. Comparison of fluconazole and nystatin oral suspensions for treatment of oral candidiasis in infants. Pediatr Infect Dis J. 2002 Dec;21(12):1165-7.

Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in candida albicans clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 Sep;50(1):25-32.

Golecka M, Oldakowska-Jedynak U, Mierzwinska-Nastalska E, Adamczyk-Sosinska E. Candida-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. Transplant Proc. 2006 Jan-Feb;38(1):155-6.

Gonzalez-Serrano J, Serrano J, Lopez-Pintor RM, Paredes VM, Casanas E, Hernandez G. Prevalence of Oral Mucosal Disorders in Diabetes Mellitus Patients Compared with a Control Group. J Diabetes Res. 2016 2016(5048967).

Greenfield RA. Host defense system interactions with Candida. J Med Vet Mycol. 1992;30(2):89-104.

Habbu PV, Mahadevan KM, Shastry RA, Manjunatha H. Antimicrobial activity of flavanoid sulphates and other fractions of Argyreia speciosa (Burm.f) Boj. Indian J Exp Biol. 2009 Feb;47(2):121-8.

Hazin R, Abuzetun JY, Suker M, Porter J. Rhabdomyolysis induced by simvastatin-fluconazole combination. J Natl Med Assoc. 2008 Apr;100(4):444-6.

Hermann C, Mesquita MF, Consani RL, Henriques GE. The effect of aging by thermal cycling and mechanical brushing on resilient denture liner hardness and roughness. J Prosthodont. 2008 Jun;17(4):318-22.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet. 1993 Oct 23;342(8878):1007-11.

Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. J Prosthet Dent. 1990 Jul;64(1):48-52.

Holmberg K. Oral mycoses and antifungal agents. Swed Dent J. 1980 4(1-2):53-61.

Hotta J, Cral WG, Sakima VT, Lara VS, Urban VM, Neppelenbroek KH. Intraoral Device for Optimal Antifungal Delivery in a Rat Model. Curr Drug Deliv. 2016 Oct 13.

Hwang EI, Ahn BT, Lee HB, Kim YK, Lee KS, Bok SH, et al. Inhibitory activity for chitin synthase II from Saccharomyces cerevisiae by tannins and related compounds. Planta Med. 2001 Aug;67(6):501-4.

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

Iqbal Z, Zafar MS. Role of antifungal medicaments added to tissue conditioners: A systematic review. J Prosthodont Res. 2016 Oct;60(4):231-239.

Isham N, Ghannoum MA. Determination of MICs of aminocandin for Candida spp. and filamentous fungi. J Clin Microbiol. 2006 Dec;44(12):4342-4.

Iwata K, Uchida K. Canditoxin, a new toxic substance from a strain of Candida albicans. Antonie van Leeuwenhoek. 1969 Jun;35(Suppl:E39-40.

Jabeur I, Martins N, Barros L, Calhelha RC, Vaz J, Achour L, et al. Contribution of the phenolic composition to the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor potential of Equisetum giganteum L. and Tilia platyphyllos Scop. Food & function. 2017 Mar 22;8(3):975-84.

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

Jeong HJ, Ryu YB, Park SJ, Kim JH, Kwon HJ, Kim JH, et al. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from Rhodiola rosea roots and their in vitro anti-influenza viral activities. Bioorganic & medicinal chemistry. 2009 Oct 01;17(19):6816-23.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in Candida albicans biofilms. Mycopathologia. 2005 Apr;159(3):353-60.

Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. Journal of ethnopharmacology. 2005 Jun 03;99(2):309-12.

Konsberg R, Axell T. Treatment of Candida-infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. Oral surgery, oral medicine, and oral pathology. 1994 Sep;78(3):306-11.

Kuhn D, George T, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum M. Antifungal susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002 46(6):1773-80.

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

Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. J Prosthet Dent. 1994 Sep;72(3):283-8.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. TheScientificWorldJournal. 2013a 2013(162750.

Kumar S, Pandey AK. Phenolic Content, Reducing Power and Membrane Protective Activities of Solanum xanthocarpum Root Extracts2013b. 301-7 p.

Lal K, Santarpia RP, Pollock JJ, Renner RP. Assessment of antimicrobial treatment of denture stomatitis using an in vivo replica model system: therapeutic efficacy of an oral rinse. J Prosthet Dent. 1992 Jan;67(1):72-7.

Lamb DJ, Martin MV. 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. 1983 Jul;4(3):205-9.

Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. FEMS microbiology letters. 2005 Jan 15;242(2):345-51.

Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, Toscano M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. Journal of agricultural and food chemistry. 2006 Aug 23;54(17):6343-51.

Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. Handbook of experimental pharmacology. 2012 211):121-33.

Lima JF, Maciel JG, Arrais CA, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Effect of incorporating antifungals on the water sorption and solubility of interim resilient liners for denture base relining. J Prosthet Dent. 2016a May;115(5):611-6.

Lima JF, Maciel JG, Hotta J, Vizoto AC, Honorio HM, Urban VM, et al. Porosity of temporary denture soft liners containing antifungal agents. J Appl Oral Sci. 2016b Sep-Oct;24(5):453-61.

Lin J, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Rimm EB, et al. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. American journal of epidemiology. 2007 Jun 01;165(11):1305-13.

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

Lorenzi H, de Abreu Matos FJ. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.

Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. Drug Des Devel Ther. 2016 10(1161-71.

Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE. Surface roughness of denture base and reline materials after disinfection by immersion in chlorhexidine or microwave irradiation. Gerodontology. 2012 Jun;29(2):e375-82.

Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology. 2001 9(1):34-9.

Mahmood N, Piacente S, Pizza C, Burke A, Khan AI, Hay AJ. The anti-HIV activity and mechanisms of action of pure compounds isolated from Rosa damascena. Biochemical and biophysical research communications. 1996 Dec 04;229(1):73-9.

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

Makila E, Honka O. Clinical study of a heat-cured silicone soft lining material. J Oral Rehabil. 1979 Apr;6(2):199-204.

Makila E, Hopsu-Havu VK. Mycotic growth and soft denture lining materials. Acta Odontol Scand. 1977 35(4):197-205.

Maleki-Dizaji N, Fathiazad F, Garjani A. Antinociceptive properties of extracts and two flavonoids isolated from leaves of Danae racemosa. Archives of pharmacal research. 2007 Dec;30(12):1536-42.

Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen Beitollahi J, Shamshiri AR. The comparative study of antifungal activity of Syzygium aromaticum, Punica granatum and nystatin on Candida albicans; an in vitro study. Journal de mycologie medicale. 2014 Dec;24(4):e163-8.

MarÍn Zuluaga DJ, Gomez Velandia OC, Rueda Clauijo DM. Denture-related stomatitis managed with tissue conditioner and hard autopolymerising reline material. Gerodontology. 2011 Dec;28(4):258-63.

Mark Saltzman W, Sheppard NF, McHugh MA, Dause RB, Alan Pratt J, Dodrill AM. Controlled antibody release from a matrix of poly(ethylene-co-vinyl acetate) fractionated with a supercritical fluid. Journal of Applied Polymer Science. 1993 48(8):1493-500.

Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of Candida albicans with C. dubliniensis in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. J Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3135-9.

Martins CH, Pires RH, Cunha AO, Pereira CA, Singulani Jde L, Abrao F, et al. Candida/Candida biofilms. First description of dual-species Candida albicans/C. rugosa biofilm. Fungal biology. 2016 Apr;120(4):530-7.

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

Mathaba L, Davies G, Warmington J. The genotypic relationship of Candida albicans strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. Journal of medical microbiology. 1995 42(5):372-9.

Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. J Dent. 1997 Sep;25(5):373-7.

McMullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of Candida albicans isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 1999 Jun;14(3):183-9.

Medeiros B, Pacheco F. Relato de um caso cl√≠nico de uma les√£o por dentadura (Estomatite por pr√≥tese) X uso de um antif√∫ngico. Revista Brasileira de Patologia Oral. 2000 1(1):1-4.

Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. Clin Microbiol Infect. 2012 Oct;18(10):E380-8.

Mitrocotsa D, Mitaku S, Axarlis S, Harvala C, Malamas M. Evaluation of the antiviral activity of kaempferol and its glycosides against human cytomegalovirus. Planta Med. 2000 May;66(4):377-9.

Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfectants in infection control. Dent Clin North Am. 1991 Apr;35(2):323-37.

Moosazadeh M, Akbari M, Tabrizi R, Ghorbani A, Golkari A, Banakar M. Denture Stomatitis and Candida Albicans in Iranian Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of dentistry. 2016 Sep;17(3 Suppl):283-92.

Murata H, Chimori H, Hong G, Hamada T, Nikawa H. Compatibility of tissue conditioners and denture cleansers: influence on surface conditions. Dent Mater J. 2010 Aug;29(4):446-53.

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

Neppelenbroek KH, Lima JF, Hotta J, Galitesi L, Almeida A, Urban VM, Effect of incorporation of antifungal agents on the ultimate tensile strength of temporary soft denture liners. J Prosthodont. 2017. In press 2017.

Newton JT. Perforation of the small bowel in mycosis fungoides treated with prednisone. The British journal of surgery. 1962 Jul;50(105-6.

Nikawa H, Iwanaga H, Hamada T, Yuhta S. Effects of denture cleansers on direct soft denture lining materials. The Journal of Prosthetic Dentistry. 1994 72(6):657-62.

Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of Candida albicans adherence to soft denture-lining materials. J Prosthet Dent. 1992 Nov;68(5):804-8.

Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H, Nakanoda S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against Candida albicans growth and/or acid production. J Oral Rehabil. 1997 May;24(5):350-7.

Novais PM, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Jorge JH. The occurrence of porosity in reline acrylic resins. Effect of microwave disinfection. Gerodontology. 2009 Mar;26(1):65-71.

Olsen I, Stenderup A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections. Acta Odontol Scand. 1990 Feb;48(1):11-8.

Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. Mycoses. 2001 Nov;44(9-10):375-8.

Otsuka N, Liu MH, Shiota S, Ogawa W, Kuroda T, Hatano T, et al. Anti-methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) compounds isolated from Laurus nobilis. Biological & pharmaceutical bulletin. 2008 Sep;31(9):1794-7.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2016 Feb 15;62(4):e1-50.

Patel MP, Cruchley AT, Coleman DC, Swai H, Braden M, Williams DM. A polymeric system for the intra-oral delivery of an anti-fungal agent. Biomaterials. 2001 Sep;22(17):2319-24.

Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies. Front Microbiol. 2015 6(1391.

Pavan S, Arioli Filho JN, Dos Santos PH, Nogueira SS, Batista AU. Effect of disinfection treatments on the hardness of soft denture liner materials. J Prosthodont. 2007 2007 Mar-Apr;16(2):101-6.

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

Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Effects of chemical disinfectants on the transverse strength of denture base acrylic resins. J Oral Rehabil. 2003 Nov;30(11):1085-9.

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

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of microbiological methods. 2008 Feb;72(2):157-65.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. J Appl Oral Sci. 2008 Mar-Apr;16(2):86-94.

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

Perez Gutierrez RM, Laguna GY, Walkowski A. Diuretic activity of Mexican equisetum. Journal of ethnopharmacology. 1985 Nov-Dec;14(2-3):269-72.

Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of Candida species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. J Prosthet Dent. 2005 Mar;93(3):288-93.

Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med. 2012 Jan;125(1 Suppl):S3-13.

Pina GM, Lia EN, Berretta AA, Nascimento AP, Torres EC, Buszinski AF, et al. Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM. 2017 2017(8971746.

Pinelli LA, Montandon AA, Corbi SC, Moraes TA, Fais LM. Ricinus communis treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. J Oral Rehabil. 2013 May;40(5):375-80.

Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary Candida in Brazilian edentulous patients. J Oral Rehabil. 2002 Nov;29(11):1115-9.

Pons V, Greenspan D, Lozada-Nur F, McPhail L, Gallant JE, Tunkel A, et al. Oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS: randomized comparison of fluconazole versus nystatin oral suspensions. Clin Infect Dis. 1997 Jun;24(6):1204-7.

Quinn DM. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of Candida albicans. J Oral Rehabil. 1985 Mar;12(2):177-82.

Rabiei M, Kasemnezhad E, Masoudi rad H, Shakiba M, Pourkay H. Prevalence of oral and dental disorders in institutionalised elderly people in Rasht, Iran. Gerodontology. 2010 Sep;27(3):174-7.

Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of Candida albicans to denture-base materials in vivo and in vitro. Crit Rev Oral Biol Med. 1999 10(1):99-116.

Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS. Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of Candida albicans. Gerodontology. 2010 27(4):292-6.

Radulovic N, Stojanovic G, Palic R. Composition and antimicrobial activity of Equisetum arvense L. essential oil. Phytother Res. 2006 Jan;20(1):85-8.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for Candida biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 Jul;98(1):53-9.

Ritchie GM, Fletcher AM, Main DM, Prophet AS. The etiology, exfoliative cytology, and treatment of denture stomatitis. J Prosthet Dent. 1969 Aug;22(2):185-200.

Rivera C, Droguett D, Arenas-Marquez MJ. Oral mucosal lesions in a Chilean elderly population: A retrospective study with a systematic review from thirteen countries. Journal of clinical and experimental dentistry. 2017 Feb;9(2):e276-e83.

Rogers TR. Antifungal drug resistance: does it matter? International journal of infectious diseases. 2002 6(S47-S53.

Ryalat S, Darwish R, Amin W. New form of administering chlorhexidine for treatment of denture-induced stomatitis. Therapeutics and clinical risk management. 2011 7(219-25.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011 Mar;16(2):e139-43.

Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite JD, Rautemaa R. Fungicidal amounts of antifungals are released from impregnated denture lining material for up to 28 days. J Dent. 2012a Jun;40(6):506-12.

Salim N, Satterthwaite J, Rautemaa R, Silikas N. Impregnation with antimicrobials has an impact on degree of conversion and colour stability of acrylic liner. Dent Mater J. 2012b 31(6):1008-13.

Samhan-Arias AK, Martin-Romero FJ, Gutierrez-Merino C. Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. Free radical biology & medicine. 2004 Jul 01;37(1):48-61.

Sánchez-Aliaga A, Pellissari CVG, Michel MD, Arrais CAG, Neppelenbroek KH, Urban VM, editors. Análise morfológica e mapeamento de superfície de reembasadores resilientes modificados pela adição de antimicrobianos. In: 30º SBPqO Annual Meeting; 2013; Águas de Lindóia, SP: [anais eletrônicos]. Bauru: USP; 2012 [acesso em 2013 jun 28].

Sánchez-Aliaga A, Pellissari CV, Arrais CA, Michél MD, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel bond strength of soft lining materials with antifungal to a denture base acrylic resin. Dent Mater J. 2016;35(2):194-203.

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

Sanita PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. Int J Prosthodont. 2012 May-Jun;25(3):232-44.

Sanita PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. Candida spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Jun;111(6):726-33.

Santos VR, Gomes RT, de Mesquita RA, de Moura MD, Franca EC, de Aguiar EG, et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. Phytother Res. 2008 Nov;22(11):1544-7.

Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Iinuma M, Tosa H, et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. Journal of ethnopharmacology. 1996 Nov;54(2-3):171-6.

Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. Aust Dent J. 1997 Oct;42(5):343-6.

Schneid TR. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. Spec Care Dentist. 1992 Nov-Dec;12(6):245-50.

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

Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranayake LP. Proteomics of drug resistance in Candida glabrata biofilms. Proteomics. 2010 Apr;10(7):1444-54.

Shannon DC, Johnson G, Rosen FS, Austen KF. Cellular reactivity to Candida albicans antigen. The New England journal of medicine. 1966 Sep 29;275(13):690-3.

Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. J Am Geriatr Soc. 2002 Mar;50(3):535-43.

Silva MM, Mima EG, Colombo AL, Sanitá PV, Jorge JH, Massucato EM, et al. Comparison of denture microwave disinfection and conventional antifungal therapy in the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical study. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology. 2012 Oct;114(4):469-79.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. Trends Microbiol. 2011 May;19(5):241-7.

Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of Candida colonization on denture liners: A systematic review. J Prosthet Dent. 2013 Aug;

Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. Journal of the American College of Nutrition. 2005 Oct;24(5):376-84.

Soysa NS, Ellepola AN. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. Oral Dis. 2005 Sep;11(5):268-73.

Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis--a brief overview. Oral Dis. 2008 Mar;14(2):138-43.

Spiechowicz E, Santarpia RP, 3rd, Pollock JJ, Renner RP. In vitro study on the inhibiting effect of different agents on the growth of Candida albicans on acrylic resin surfaces. Quintessence Int. 1990 Jan;21(1):35-40.

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

Srinivasan M, Gulabani M. A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research. 2010 Jul-Sep;21(3):353-6.

Tan H, Woo A, Kim S, Lamoureux M, Grace M. Effect of denture cleansers, surface finish, and temperature on Molloplast B resilient liner color, hardness, and texture. J Prosthodont. 2000 Sep;9(3):148-55.

Tay LY, Jorge JH, Herrera DR, Campanha NH, Gomes BP, Andre Dos Santos F. Evaluation of different treatment methods against denture stomatitis: a randomized clinical study. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology. 2014 Jul;118(1):72-7.

Taylor RL, Bulad K, Verran J, McCord JF. Colonization and deterioration of soft denture lining materials in vivo. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2008 Jun;16(2):50-5.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of Candida albicans and non-albicans Candida species under dynamic and anaerobic conditions. Archives of oral biology. 2007 Aug;52(8):761-7.

Thompson GR, 3rd, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Apr;109(4):488-95.

Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. The Journal of Prosthetic Dentistry. 1994 71(5):517-24.

Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi EM, Posteraro P, Losito AR, De Luca A, et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. PloS one. 2012 7(3):e33705.

Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm production by Candida species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1843-50.

Urban VM, Lima TF, Bueno MG, Giannini M, Arioli Filho JN, de Almeida AL, et al. Effect of the addition of antimicrobial agents on Shore A hardness and roughness of soft lining materials. J Prosthodont. 2015 Apr;24(3):207-14.

Urban VM, Seo RS, Giannini M, Arrais CA. Superficial distribution and identification of antifungal/antimicrobial agents on a modified tissue conditioner by SEM-EDS microanalysis: a preliminary study. J Prosthodont. 2009 Oct;18(7):603-10.

Valerio LG, Jr., Gonzales GF. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (Uncaria tomentosa) and Maca (Lepidium meyenii): a critical synopsis. Toxicol Rev. 2005 24(1):11-35.

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

Verran J, Maryan CJ. Retention of Candida albicans on acrylic resin and silicone of different surface topography. J Prosthet Dent. 1997 May;77(5):535-9.

Wasteson Y, Hoie S, Roberts MC. Characterization of antibiotic resistance in Streptococcus suis. Vet Microbiol. 1994 Jul;41(1-2):41-9.

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

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. Aust Dent J. 1998 Feb;43(1):45-50.

Weerasuriya N, Snape J. Oesophageal candidiasis in elderly patients: risk factors, prevention and management. Drugs Aging. 2008 25(2):119-30.

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 1998 Apr;11(2):382-402.

Windholz M, Budavari S, Blumetti R, Otterbein E. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 3rd edn. Rahway, NJ: Merck and Co. Inc. 1983.

Xu HX, Lee SF. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. Phytother Res. 2001 Feb;15(1):39-43.

Yilmaz H, Aydin C, Bal BT, Ocak F. Effects of different disinfectants on physical properties of four temporary soft denture-liner materials. Quintessence Int. 2004 2004 Nov-Dec;35(10):826-34.

Yordanov M, Dimitrova P, Patkar S, Saso L, Ivanovska N. Inhibition of Candida albicans extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in Candida infection. Can J Microbiol. 2008 Jun;54(6):435-40.

Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaee N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. Med Mycol. 2011a Feb;49(2):208-11.

Zomorodian K, Rahimi MJ, Pakshir K, Motamedi M, Ghiasi MR, Rezashah H. Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of Candida species. J Glob Infect Dis. 2011b Oct;3(4):357-60.

APÊNDICE

Apêndice A

Phytotherapy Research

Phytotherapy Research

© John Wiley & Sons Ltd

Edited By: Elizabeth M. Williamson, Angelo A Izzo, Sung Hoon-Kim and Rajan Radhakrishnan

Impact Factor: 3.092

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2016: 19/60 (Chemistry Medicinal); 81/256 (Pharmacology & Pharmacy)

Online ISSN: 1099-1573

Author Guidelines

NIH Public Access Mandate
For those interested in the Wiley Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, please visit our policy statement

For additional tools visit Author Resources - an enhanced suite of online tools for Wiley Online Library journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

- Permission Request Form

Author Guidelines

Phytotherapy Research is a monthly, international journal for the publication of original research papers, short communications, reviews and letters on medicinal plant research. Key areas of interest are pharmacology, toxicology, and the clinical applications of herbs and natural products in medicine, from case histories to full clinical trials, including studies of herb-drug interactions and other aspects of the safety of herbal medicines. Papers concerned with the effects of common food ingredients and standardised plant extracts, including commercial products, are particularly welcome, as are mechanistic studies on isolated natural products.

Short communications dealing with the pharmacology and screening of crude or uncharacterised extracts will be considered for publication only if they are clearly of interest to our international readership and are not deemed more suitable for a regional audience.

Short communications dealing with the pharmacology and screening of crude or uncharacterised extracts will be considered for publication only if they are clearly of interest to our international readership and are not deemed more suitable for a regional audience.

Phytotherapy Research does not publish agricultural, phytochemical, structure elucidation, quality control or botanical identification papers unless directly pertinent to the pharmacological effects or overall safety of plant based medicines currently in use.

Manuscript Submission. *Phytotherapy Research* operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click http://mc.manuscriptcentral.com/ptr to navigate to the *Phytotherapy Research* online submission site.

All papers must be submitted via the online system.

Authors are welcome to submit the names and contact details of up to three suggested reviewers, using the online system. Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are *.doc, *.docx and *.rtf. Figures must be provided in *.tiff or *.eps format.

Upon acceptance, authors **must** supply by e-mail to the Production Editor: permission grants, quoting the manuscript code. If the manuscript contains extracts, including illustrations, from other copyright works (including material from on-line or intranet sources) it is the author's responsibility to obtain written permission from the owners of the publishing rights to reproduce such extracts using the Wiley Permission Request Form.

Manuscript Style. The language of the journal is English. Please ensure that your manuscript has been checked by an English language expert if there is concern for grammatical or other errors. All submissions including book reviews must have a title, be double-line spaced with type no smaller than 12 point, and have a margin of 3cm all round. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate Image files.

- The **title page** must list the full title, short title of up to 60 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs.
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.
- Supply an **abstract** of up to 200 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.
- Authors may suggest up to 3 potential reviewers
- A concise **introduction** is required of the background to the subject, its significance and its relationship to earlier works, with references.
- **Materials and methods** should be presented with clarity and detail. State the original and important findings in the **results**. Illustrate these with figures or tables where necessary but keep these to a minimum.
- **Results and discussion** may be combined as one section. Discuss the principal conclusions drawn from the results and their important implications.
- **Convention on biodiversity.** Authors must indicate that they have obtained authority to access plant samples (other than freely available commercial crops or herbal products) used for research and that this has been authorised by the appropriate agent of the government of the source country as required under the framework of the United Nations Convention on Biodiversity.

- **Botanical aspects.** Plant materials used must be adequately described using the Latin binomial for the plant, author of the name, plant family, source (e.g. country and region of collection, name of the collector and collection number) means of unambiguous identification (e.g. name and affiliation of expert botanist or the results of comparison with a published monograph and/or authenticated reference specimen). The reference number and place of deposition of a voucher specimen of the plant material must be given. For papers relating to crude plant extracts, the method of extraction and the yield of dried extract as a percentage weight of the starting fresh or dried plant material must also be stated. These should be submitted as short communications (see below).
- **Experimental procedures.** Bioassay data for plant extracts or isolated compounds must be accompanied by data for positive and negative controls. All animal experiments should be conducted in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, the EEC Directive of 1986 (86/609/EEC) or the NIH guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publication No. 80-23; revised 1978). The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal procedures used.
- Use Chemical Abstracts nomenclature for chemical names and structures. Use proper or proprietary names with caution. Common acronyms for biomedical names are acceptable but define all others when first mentioned. Define abbreviations when first mentioned and do not use in the title or abstract. Define non-standard units.
- Keep acknowledgements brief and place them at the end of the paper.

Original Papers. These should not exceed five printed pages including a maximum of four figures and/or four tables and 30 references, (where one page comprises 800 words or the equivalent in illustrative and tabular material).

Short Communications. These must be complete, self-contained papers, and not preliminary reports. These should not exceed two printed pages including a maximum of two figures and/or two tables and 10 references. To exceed the limit may delay acceptance or publication of the paper.

Reviews and Keynote Lecture Transcripts. These will usually be written at the invitation of the Editors. Unsolicited reviews and manuscripts based on Conference Keynote Lectures will be welcome but authors wishing to submit these are requested to consult the Editor beforehand, ideally prior to commencement of writing. Reviews should include a Table of Contents and will normally be limited to 10,000 words including references and should be submitted via the online system.

Correspondence. Items submitted for the **correspondence columns**, which need have no fixed format are intended for constructive comments on published work or for putting forward new ideas and are published at the discretion of the Editors.

Pre-Submission English Language Editing Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. Japanese authors can also find a list of local English improvement services at http://www.wiley.co.jp/journals.editcontribute.html. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Reference style. References should be quoted in the text as name and year, and listed at the end of the paper alphabetically. All references must be complete and accurate. *Phytotherapy Research* uses *Index Medicus Style* abbreviations for journals cited. For correct abbreviations visit http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7251/#IX-E. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. References should be listed in the following style:

Journals: Wright CW, Phillipson JD. 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* **4:** 127-139.

Books: Wagner H, Bladt S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (2nd edn). Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Chapters in Books: Kips RH. 1985. Environmental aspects. In *Pesticide Application: Principles and Practice* , Haskel PT (ed). Oxford University Press: Oxford; 1-34.

Illustrations. Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, with the lead author's name, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Please supply artwork at the intended size for printing, sized to the text width of 84mm/single column, 176mm/double column.Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc. - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

The cost of printing **colour** illustrations in the journal will be charged to the author. If colour illustrations are supplied electronically in either TIFF or EPS format, they **may** be used in the PDF of the article at no cost to the author, even if this illustration was printed in black and white in the journal. The PDF will appear on the *Wiley Online Library* site.

OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Copyright Transfer Agreement. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement. If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions

For authors choosing OnlineOpen. If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services and visit http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: http://www.wiley.com/go/funderstatement.

Further Information. Proofs will be sent to the author for checking. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only (unless otherwise stated). Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Reprints of your article and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Authors Resources: Manuscript now accepted for publication?

If so, check out our suite of tools and services for authors and sign up for:

- Article Tracking
- E-mail Publication Alerts
- Personalization Tool

PEER Project

This journal is participating in the PEER Project, an EU-funded initiative to examine the impact on scholarly journals of depositing accepted manuscripts in web-based repositories. If the corresponding author is based in an EU country, we will deposit the accepted manuscript into a central project repository (DRIVER). The article's availability will be subject to a post-publication embargo. This project has no effect on your rights or obligations under the terms of the copyright agreement pertaining to this journal.

Conflict of Interest. All authors must declare financial/commercial conflicts of interest. Even if there is none, this should be stated in a separate paragraph following on from the Acknowledgements section. This is a mandatory requirement for **all** articles.

Guidelines for Cover Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please follow these general guidelines.

Apêndice B

B1 Obtenção do extrato hidroetanólico do *E. giganteum*

A obtenção do extrato hidroetanólico do *E. giganteum* seguiu a metodologia utilizada no estudo de Alavarce et al. (2015). A coleta do *E. giganteum* foi realizada no Jardim Botânico Municipal de Bauru, localizado às margens da rodovia Comandante João Ribeiro de Barros-SP 225 (22°20′30″S e 49°00′30″W). Foram coletados aproximadamente 5 kg de material fresco de *E. giganteum*, os quais foram preparados, identificados e depositados na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquista Filho" (Bauru, SP, Brasil) sob o número 5795. As partes aéreas da planta foram secas em estufa a 45ºC por 48 h (Mod. MA 035/5, Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP, Brazil) e trituradas em liquidificador e, em seguida, em moinho de facas (Mod. MA 048, Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP, Brazil) para obtenção de um pó fino, a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos (Figura 1A-C).

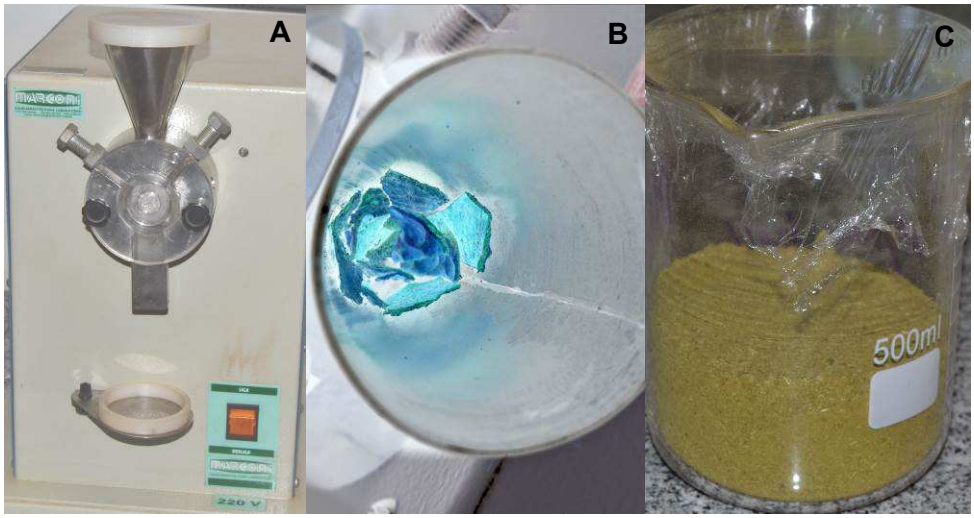

FIGURA 1: Trituração das partes aéreas do *E. giganteum*: (A) Moinho de facas; (B) Trituração; (C) Pó do fitoterápico resultante da trituração.

A extração foi feita por percolação (Percolador VT-0965, Merse Artigos P/ Laboratorio Ltda., Campinas, SP, Brazil) do pó com solvente orgânico etanol a 70% - EtOH/H_2O (7:3 v/v) em temperatura ambiente. O material moído (1,468 kg) foi previamente intumescido com 2 L de EtOH/H_2O durante 2 h em béquer (Figura 2A). Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura do pó e solvente (Figura 2B-C). A altura do enchimento obedeceu à proporção 5:1 (referente ao volume do percolador e do material vegetal). A vazão do percolador foi entre 1-2,0

mL.min-1Kg de material vegetal (Figura 2D). Após a extração, a solução foi concentrada em Evaporador Rotativo (Heidolph rotavac, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Figura 2E), sob pressão reduzida em temperatura inferior a 40°C e, então, submetida à remoção total dos solventes orgânicos (Figura 2F). Ao final, o extrato líquido foi mantido congelado (-20°C) em freezer (Figura 2G) até o momento da liofilização, para obtenção do extrato hidroetanólico em pó (EtOH 70%). Após condensar aproximadamente 500 mL de extrato em Evaporador Rotativo, a amostra final obtida foi dividida em 10 tubos cônicos de 15 mL (5 mL em cada) e os mesmos foram congelados a -20°C por 24 h. Após esse período, os tubos foram colocados em béqueres de 600 mL e de 300 mL próprios do liofilizador (FreeZone® 2.5 Liter Feeze Dry Systems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e encaixados com as suas respectivas tampas, contendo filtros que impedem o extravasamento do conteúdo do frasco para o interior da máquina, em diferentes bocais do aparelho. O processo iniciou-se por meio do ajuste automático do equipamento. Por se tratar de tecidos vegetais, utilizou-se a temperatura da amostra em torno de -40°C e a temperatura do coletor do aparelho em -80°C, por aproximadamente 60 h. Quando a temperatura do aparelho alcançou -80°C e o vácuo associado ao aparelho alcançou aproximadamente 0,133 mbar, o aparelho iniciou o procedimento de liofilização (Figura 2H). Após 60 h, as amostras foram retiradas do aparelho e o vácuo foi liberado. Com o auxílio de espátulas e pincéis, a amostra (em pó) foi retirada dos tubos e acondicionada em um recipiente de vidro já tarado para se conhecer posteriormente o rendimento da amostra (8,24%) (Figura 2I). As amostras foram armazenadas em dessecador plástico (Mod. 08010-250, Alquilabor Suprimentos Analíticos, São José dos Campos, SP, Brazil) mantido a vácuo para evitar o umedecimento das mesmas até sua utilização.

FIGURA 2: Percolação, concentração e liofilização do *E. giganteum*: (A) Entumecimento com EtOH/H_2O por 2 h; (B) Percolador empacotado; (C) Extração em percolador- colocação do material vegetal entumecido acima e enchimento na proporção 5:1; (D) Solução resultante da percolação; (E) Rotaevaporador; (F) Concentração da solução no rotaevaporador para obtenção do extrato líquido; (G) Congelamento do extrato líquido; (H) Liofilização do extrato congelado para obtenção do extrato em pó; (I) extrato hidroetanólico em pó.

B2 Ilustração da metodologia

A metodologia da confecção dos corpos de prova de forma asséptica em câmara de fluxo laminar com ambos os materiais resilientes selecionados para este estudo está ilustrada na Figura 3. A aplicação superficial do fitoterápico nos corpos de prova por meio do primer foi realizada como ilustrado na Figura 4.

FIGURA 3: Confecção asséptica dos corpos de prova- (A) Materiais utilizados no interior na câmera de fluxo laminar; (B) Proporção individual dos pós dos materiais resilientes temporários; (C) Proporção individual dos líquidos dos materiais; (D) Manipulação após incorporação do pó ao líquido; (E) Colocação do material na matriz metálica (10 mm x 1 mm); (F) Prensagem para plastificação entre placas de vidro; (G) Remoção dos excessos; (H) Corpos de prova finalizados (10 mm x 1 mm) em poços de placas de cultura.

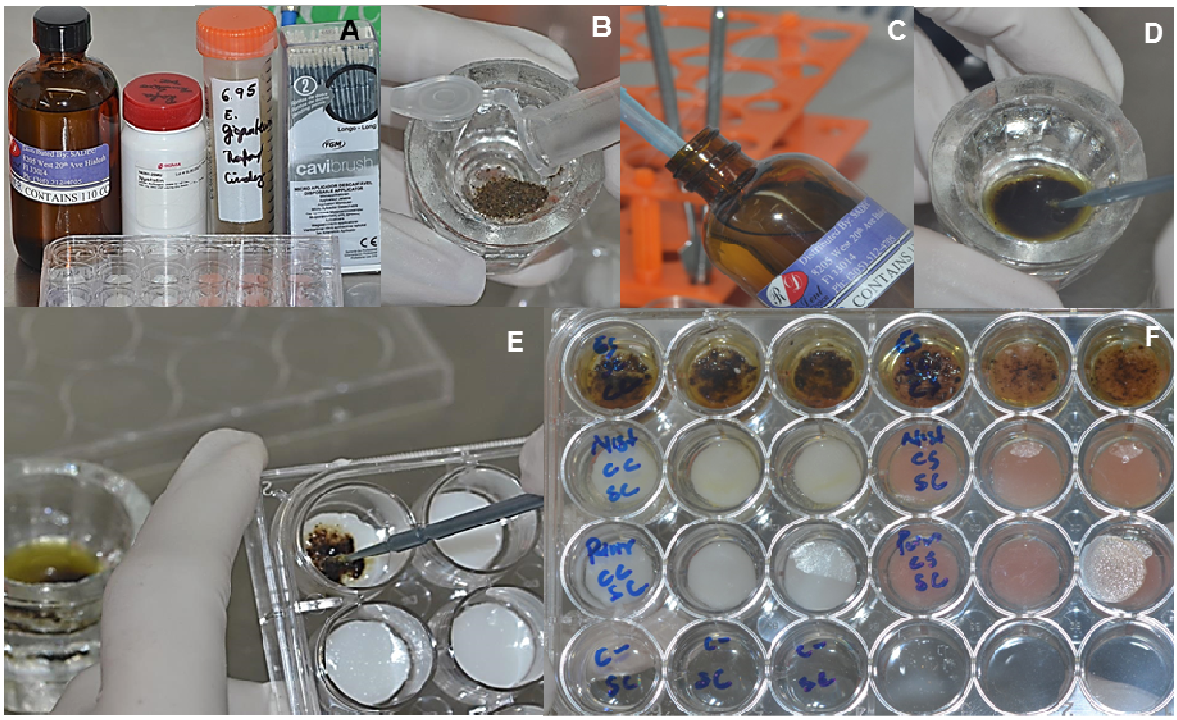

FIGURA 4: Aplicação superficial do fitoterápico nos corpos de prova- (A) Materiais utilizados; (B) *E. giganteum* na CIM estabelecida; (C) Proporção do *primer* (1 mL); (D) Mistura do *primer* ao fitoterápico; (E) Aplicação da mistura na superfície do corpo de prova em cada poço de cultura; (F) Corpos de prova pertencentes aos diferentes grupos de estudo (tratados ou não superficialmente).

A metodologia de contagem de colônias viáveis em placas de Petri (UFC/mL) utilizada neste estudo para a avaliação da inibição do biofilme fúngico está ilustrada na Figura 5.

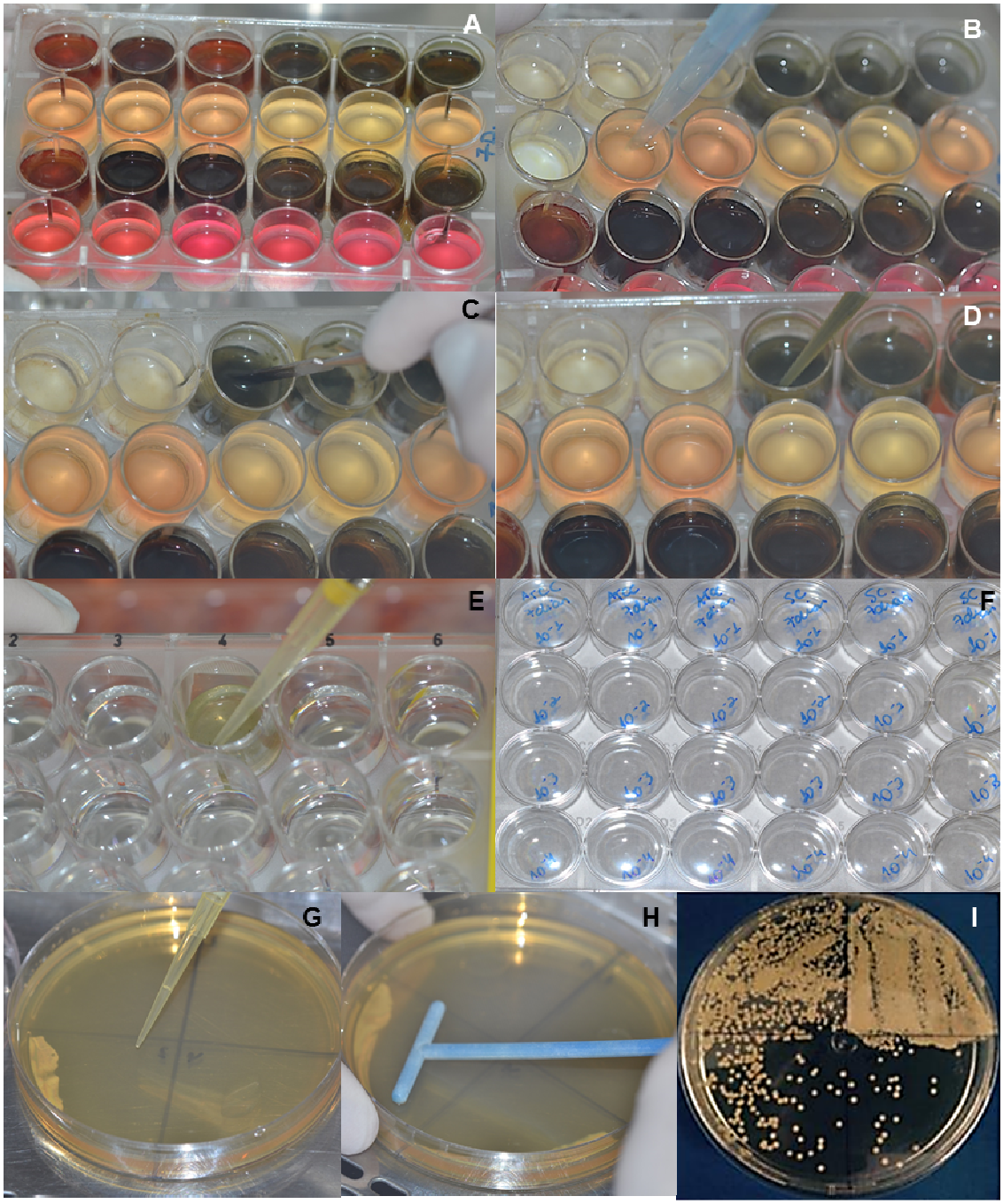

FIGURA 5: Contagem de colônias viáveis (UFC/mL) – (A) Biofilme formado sobre os corpos de prova nos poços da placa de cultura; (B) Lavagem dos corpos de prova com PBS para remoção das células não aderidas; (C) Raspagem do biofilme dos corpos de prova; (D) Homogeneização do biofilme raspado por meio de pipetagens; (E) Diluições seriadas em PBS entre 10^{-1} a 10^{-4} das suspensões homogeneizadas nos poços da placa de cultura; (F) Tampa da placa de cultura com a identificação das diluições seriadas por grupo de estudo; (G) Pipetagem de uma alíquota de 25 µL de cada diluição por quadrante da placa de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose; (H) Espalhamento de cada alíquota com alça de Drigalski; (I) Placa de Petri com colônias viáveis referentes a cada diluição após 48 h de incubação a 37º C para a quantificação de UFC/mL e porcentagens de inibição fúngica.

Apêndice C

Tabela C1- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **SC 5314** formado sobre o **material Coe-Comfort** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **24 h**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	400000	-
Ct	56000	-
Ct	23200	-
Ct	3440000	-
Ct	3120000	-
Ct	3720000	-
Ct	436000	-
Ct	344000	-
Ct	1112000	-
EG	2800	94,80
EG	18800	69,29
EG	19600	99,79
EG	4000	99,88
EG	3200	99,90
EG	800	99,98
EG	84000	80,73
EG	44000	87,21
EG	78000	92,99
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (*primer* sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C2- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **SC 5314** formado sobre o **material Coe-Soft** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **24 h**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	1000000	-
Ct	4800	-
Ct	2000	-
Ct	4000000	-
Ct	3600000	-
Ct	3600000	-
Ct	640000	-
Ct	52000	-
Ct	80000	-
EG	13200	96,70
EG	16000	71,43
EG	52000	0,00
EG	204000	94,07
EG	112000	96,41
EG	7200	99,81
EG	28000	93,58
EG	198000	54,59
EG	29800	93,17
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (primer sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C3- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **ATCC 90028** formado sobre o **material Coe-Comfort** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **24 h**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	13600	-
Ct	10800	-
Ct	17200	-
Ct	13600	-
Ct	10800	-
Ct	17200	-
Ct	212000	-
Ct	30000	-
Ct	376000	-
EG	10000	99,69
EG	10800	99,65
EG	5600	99,71
EG	600	99,99
EG	0	100,00
EG	800	99,99
EG	48000	77,36
EG	16000	95,74
EG	16000	95,74
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (primer sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C4- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **ATCC 90028** formado sobre o **material Coe-Soft** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **24 h**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	3200	-
Ct	3600	-
Ct	8800	-
Ct	44000	-
Ct	64000	-
Ct	112000	-
Ct	24000	-
Ct	8400	-
Ct	3200	-
EG	0	100,00
EG	2000	99,94
EG	0	100,00
EG	400	100,00
EG	2800	99,99
EG	4800	99,96
EG	12000	50,00
EG	58000	0,00
EG	40000	99,50
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (primer sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C5- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **SC 5314** formado sobre o **material Coe-Comfort** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **7 dias**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	28400000	-
Ct	29200000	-
Ct	12800000	-
Ct	1280000	-
Ct	1000000	-
Ct	840000	-
Ct	1280000	-
Ct	1640000	-
Ct	2000000	-
EG	16800	99,94
EG	11200	99,96
EG	7200	99,94
EG	176000	92,50
EG	112000	87,60
EG	144000	86,67
EG	272000	78,75
EG	364000	77,80
EG	64000	96,80
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (*primer* sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C6- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **SC 5314** formado sobre o **material Coe-Soft** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **7 dias**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	8800000	-
Ct	20400000	-
Ct	21200000	-
Ct	1720000	-
Ct	1400000	-
Ct	1280000	-
Ct	9600000	-
Ct	16800000	-
Ct	8400000	-
EG	800000	90,91
EG	1320000	93,53
EG	1360000	93,58
EG	3200	99,81
EG	4400	99,69
EG	5600	99,56
EG	400000	95,83
EG	400000	97,62
EG	80000	99,05
Nis	400	100,00
Nis	120000	99,41
Nis	40000	99,81
Nis	400	99,98
Nis	120000	91,43
Nis	40000	96,88
Nis	1600	99,98
Nis	44000	99,74
Nis	0	100,00

Ct: controle (primer sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C7- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **ATCC 90028** formado sobre o **material Coe-Comfort** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **7 dias**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	2840000	-
Ct	2000000	-
Ct	3080000	-
Ct	960000	-
Ct	840000	-
Ct	720000	-
Ct	2640000	-
Ct	3440000	-
Ct	10800000	-
EG	6800	99,76
EG	3200	99,84
EG	5600	99,82
EG	56000	94,17
EG	32000	96,19
EG	24000	96,67
EG	128000	95,15
EG	400000	88,37
EG	152000	98,59
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (primer sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C8- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **ATCC 90028** formado sobre o **material Coe-Soft** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **7 dias**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	1920000	-
Ct	1640000	-
Ct	1960000	-
Ct	1520000	-
Ct	1960000	-
Ct	1000000	-
Ct	8000000	-
Ct	2000000	-
Ct	4000000	-
EG	240000	87,50
EG	560000	65,85
EG	600000	69,39
EG	400	99,97
EG	3200	99,84
EG	2000	99,80
EG	32000	99,60
EG	20000	99,00
EG	6400	99,84
Nis	2000	99,90
Nis	0	100,00
Nis	800	99,96
Nis	2000	99,87
Nis	0	100,00
Nis	800	99,92
Nis	8000	99,90
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (primer sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C9- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **SC 5314** formado sobre o **material Coe-Comfort** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **14 dias**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	8400000	-
Ct	13200000	-
Ct	10800000	-
Ct	7600000	-
Ct	6800000	-
Ct	5600000	-
Ct	7200000	-
Ct	6000000	-
Ct	4800000	-
EG	1080000	87,14
EG	1040000	92,12
EG	920000	91,48
EG	0	100,00
EG	0	100,00
EG	0	100,00
EG	400000	94,44
EG	0	100,00
EG	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (*primer* sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C10- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans* SC 5314** formado sobre o **material Coe-Soft** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **14 dias**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	26800000	-
Ct	29600000	-
Ct	37200000	-
Ct	5200000	-
Ct	4400000	-
Ct	4000000	-
Ct	5200000	-
Ct	6400000	-
Ct	3600000	-
EG	23600	99,91
EG	2400000	91,89
EG	2000000	94,62
EG	800	99,98
EG	1200	99,97
EG	1600	99,96
EG	800000	84,62
EG	400000	93,75
EG	0	100,00
Nis	800	99,99
Nis	0	100,00
Nis	400	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (*primer* sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C11- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **ATCC 90028** formado sobre o **material Coe-Comfort** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **14 dias**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	25200000	-
Ct	14400000	-
Ct	24400000	-
Ct	3600000	-
Ct	2800000	-
Ct	4400000	-
Ct	7200000	-
Ct	6000000	-
Ct	4800000	-
EG	5600	99,98
EG	4800	99,97
EG	800	100,00
EG	400	99,99
EG	400	99,99
EG	400	99,99
EG	0	100,00
EG	0	100,00
EG	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (primer sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C12- Valores médios de UFC/mL e porcentagens de inibição do biofilme de ***C. albicans*** **ATCC 90028** formado sobre o **material Coe-Soft** após os diferentes tratamentos superficiais no período de incubação de **14 dias**.

Tratamento	UFC/mL	% de inibição
Ct	4800000	-
Ct	6400000	-
Ct	2360000	-
Ct	6800000	-
Ct	4800000	-
Ct	3600000	-
Ct	3200000	-
Ct	2400000	-
Ct	4400000	-
EG	320000	93,33
EG	1160000	81,88
EG	280000	88,14
EG	800	99,99
EG	400	99,99
EG	800	99,98
EG	0	100,00
EG	0	100,00
EG	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00
Nis	0	100,00

Ct: controle (*primer* sem fármaco); EG: *E. giganteum;* Nis: nistatina
% de inibição pelo *primer* modificado com fármacos em relação ao controle (apenas *primer*)

Tabela C13- ANOVA 4 fatores para os dados de porcentagens de inibição.

Efeito	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	*P*
	1329056,9685	1,0000	1329056,9685	15090,9205	0,0000
Material (A)	181,8171	1,0000	181,8171	2,0645	0,1519
Tratamento (B)	667658,5700	2,0000	333829,2850	3790,5006	0,0000
Cepa (C)	24,6245	1,0000	24,6245	0,2796	0,5974
Período (D)	775,7432	2,0000	387,8716	4,4041	0,0131
A*B	307,3394	2,0000	153,6697	1,7449	0,1765
A*C	13,3548	1,0000	13,3548	0,1516	0,6973
B*C	31,6634	2,0000	15,8317	0,1798	0,8356
A*D	181,4463	2,0000	90,7232	1,0301	0,3583
B*D	1593,8097	4,0000	398,4524	4,5243	0,0015
C*D	4,8438	2,0000	2,4219	0,0275	0,9729
A*B*C	44,5527	2,0000	22,2764	0,2529	0,7767
A*B*D	420,5245	4,0000	105,1311	1,1937	0,3137
A*C*D	94,1387	2,0000	47,0693	0,5345	0,5866
B*C*D	27,3903	4,0000	6,8476	0,0778	0,9890
A*B*C*D	237,1291	4,0000	59,2823	0,6731	0,6111
Erro	25364,1523	288,0000	88,0700		