

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

SILVIO LUIZ VIEIRA OLIVEIRA

**Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas
de prata e zircônia incorporadas em verniz
fotopolimerizável contra biofilme de *Candida albicans***

BAURU
2023

SILVIO LUIZ VIEIRA OLIVEIRA

Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata e zircônia incorporadas em verniz fotopolimerizável contra biofilme de *Candida albicans*

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

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

Versão Corrigida

BAURU
2023

Oliveira, Silvio Luiz Vieira

Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata e zircônia incorporadas em verniz fotopolimerizável contra biofilme de *Candida albicans* / Silvio Luiz Vieira Oliveira. -- Bauru, 2023.
97 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2023.

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

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

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

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº:
Data:

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação



FOLHA DE APROVAÇÃO

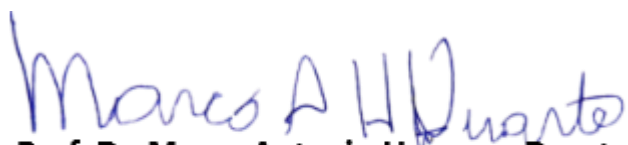
Dissertação apresentada e defendida por
SILVIO LUIZ VIEIRA OLIVEIRA
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 03 de março de 2023.

Prof. Dr. **JOSE BURGOS PONCE**
UNIFAI

Prof. Dr. **HELITON GUSTAVO DE LIMA**
UFPR

Prof.^a Dr.^a **BRUNNA MOTA FERRAIRO**
FOB-USP

Prof.^a Dr.^a **VANESSA SOARES LARA**
Presidente da Banca
FOB - USP


Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FOB-USP

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos aqueles que, em algum momento de fraqueza, duvidaram do seu próprio potencial, mas que, ainda assim, encontraram alternativas para atingir seus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À **mim** mesmo, pela perseverança, determinação, garra e coragem. Espero que no futuro eu seja capaz de olhar para trás e me orgulhar de quem fui e de quem me tornei. Que daqui alguns anos eu não me arrependa de ter tentado novos caminhos e por ter saído, às pressas, da minha zona de conforto. Que eu seja grato pelas minhas conquistas, realizado pelos esforços que fiz e que, ainda, eu consiga enxergar a mim mesmo como merecedor das minhas conquistas.

À minha família, em especial aos meus pais **Luis Carlos Oliveira** e **Vanderlea Aparecida Vieira Oliveira** por tanto. Dois seres humanos incríveis que, diante tantas dificuldades, não hesitaram em depositar em mim seus sentimentos de confiança e orgulho. Quero que saibam que consigo ver nos seus olhos o quanto se orgulham de mim. Obrigado por respeitarem meu espaço, por aceitarem a pessoa que eu sou e por não ter medido esforços para apoiar os meus estudos. Hoje sou mais feliz porque pude viver, desde minha adolescência, quem eu realmente sou. Que eu possa, algum dia, devolver em orgulho e satisfação todo o empenho que vocês tiveram por mim.

Ao meu companheiro de vida e amigo **Cesar Salgado Claudio** que, por muito tempo, se dedicou integralmente em me apoiar financeira e emocionalmente, que dividiu comigo meus piores momentos e que me viu chorar e sofrer inúmeras vezes. Obrigado por acreditar no meu potencial e por não hesitar em depositar em mim a sua confiança. Obrigado pela presença, pela companhia, pelo companheirismo e por todo o amor ao longo de todos esses anos. Se eu sou uma pessoa melhor hoje, é porque eu tive você. Você me ensinou a ser uma pessoa melhor: mais paciente, mais educado e mais ponderado. Jamais poderei retribuir tamanha generosidade. Obrigado por ser você e obrigado por estar comigo.

Às minhas melhores amigas **Bianca Lopes de Oliveira** e **Giovana de Assis Marcolino** que sempre estiveram comigo me apoiando, me impulsionando e me respeitando. Amigas inteligentes, prudentes, engraçadas e, sobretudo, as pessoas mais fiéis que eu poderia conhecer. Vocês estiveram e tenho a certeza de que estarão comigo para sempre, mesmo que à distância, me apoiando e dividindo comigo as

minhas frustrações. Se eu permaneço com os pés no chão, é porque vocês são mulheres incríveis e empoderadas que, diariamente, compartilham comigo os momentos de felicidade, de tristeza, de incertezas e de inseguranças. Vocês me permitem, com lucidez, ver que a vida é recheada de decepções, mas que no final de tudo, está tudo bem. Muito obrigado, amigas.

À minha incrível companheira de laboratório, professora e co-orientadora nas horas vagas, **Nara Lígia Martins Almeida** que, sem qualquer expectativa de reciprocidade, dividiu comigo todo seu conhecimento teórico, técnico e emocional. Que com sua absoluta generosidade, me mostrou que nenhum título acadêmico tira de você a capacidade de ser sensível e humilde. Foi você quem, durante os finais de semana, domingos e feriados, dividiu e compartilhou comigo histórias de uma vida real. Por isso, quero que saiba que me identifiquei com a sua trajetória e por toda dificuldade que enfrentou e, por isso, anseio todos os dias ser no futuro um pouco do que você é hoje. Eu me orgulho por ter te conhecido e agradeço por ter me mostrado que nenhum título pode tirar a minha essência. Você é grata pela sua história e eu sou grato por ter te conhecido. Muito obrigado.

Ao professor **Heitor Marques Honório** pelo domínio e conhecimento em bioestatística, com quem tive o prazer de aprender um pouco sobre metodologia acadêmica. Eu sempre digo que só quem faz parte do ambiente acadêmico em ciências biológicas sabe como é difícil dominar a bioestatística. O senhor ensina porque sabe ensinar e o faz porque ama fazer, além de fazer isso como ninguém: de forma inteligente, metodológica, interativa, criativa e não burocrática. Muito obrigado, professor.

À **todos** aqueles que de alguma forma estiveram comigo ao longo dessa caminhada: amigos, professores e colegas. Espero que vocês possam sentir minha gratidão pela companhia, pelos bons e maus momentos. Obrigado por compartilhar comigo os momentos de felicidade, mas também os de tristeza. Eu sou um mosaico em construção das melhores partes de cada um que passou pela minha vida. Muito obrigado por acreditarem no meu potencial, jamais conseguirei agradecer o suficiente.

À minha orientadora **Profª. Drª. Vanessa Soares Lara**

Professora, não tenho palavras para descrever minha gratidão pela sua orientação. Sempre foi para mim mais que uma orientadora, foi uma mãe. Meus olhos sempre se enchem de lágrimas quando me lembro da minha trajetória na FOB e do que a senhora fez (e continua fazendo) para me manter nesta universidade. Eu costumo dizer que relembrar momentos de felicidade nem sempre são momentos felizes, mas relembrar momentos de tristeza sempre são momentos tristes.

Para mim, a universidade – em especial a pública – precisa ser um ambiente de exemplo para a sociedade. Dentro dela, pelo menos, todos precisam ser respeitados independentemente da sua raça, etnia, crença, identidade de gênero e/ou orientação sexual. No entanto, enquanto aluno, posso dizer que sempre tive um receio grande e profundamente enraizado de que, cursar uma pós-graduação em uma grande universidade, poderia ser uma experiência segregadora. Mas, quero que saiba que, em um mundo de poucas exceções, a senhora é uma delas. Mais que me orientou, me acolheu. Jamais conseguirei ser grato o suficiente.

Ao longo dessa pós-graduação, eu percebi que ‘ser grato’ está no reconhecer que todos nós passamos por momentos difíceis durante a vida, mas que não os enfrentamos sozinhos. Por isso, quero agradecer por ter me ouvido, orientado, aconselhado e, sobretudo, confiado em mim. Me desculpe por tantas vezes que me viu chorar, eu sei que sou um pouco sensível mesmo. Além disso, como a senhora já sabe, sou um pouquinho ansioso, mas foi sob sua orientação que aprendi a ser mais paciente, calmo e ponderado, o que contribuiu para o meu crescimento como pessoa e como profissional.

Obrigado por acreditar no meu potencial e por me ajudar a acreditar que, com determinação, cautela e inteligência, é possível chegar lá. Embora eu ainda duvide um pouco das minhas capacidades, concluo essa pós-graduação mais consciente e maduro do que quando entrei e, sem dúvidas, a senhora faz parte disso. Mil vezes, obrigado, professora. Eu te admiro.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)**.

À Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), representada pela excelentíssima Diretora **Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf** que, do início ao fim da minha história nesta universidade, não se isentou nem mediu esforços para me fornecer todo o apoio necessário para a minha permanência nesta universidade.

Ao Laboratório de Cromatografia e Analítica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/Bauru – Departamento de Química) que, sob a supervisão do **Prof^o Dr. Fenelon Martinho Lima Pontes**, sintetizou e forneceu os nanomateriais utilizados neste trabalho.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, representada pelo atual Presidente, **Prof^o. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru, representada pela **Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira**, responsável por esta área.

“Tudo é considerado impossível até acontecer”

Nelson Mandela

RESUMO

A estomatite protética (EP) é uma doença multifatorial e muito frequente em usuários de próteses totais removíveis (PTR), principalmente as superiores, sendo muito associada com a presença de biofilme microbiano sobre a base das PTR. O fungo *Candida spp.* é a principal família de microorganismos encontrada neste biofilme, sendo a espécie *C. albicans* a mais observada. Neste sentido, muitos fatores locais contribuem para a formação do biofilme e, conseqüentemente, para a ocorrência da EP, dentre os quais incluem a rugosidade superficial e o caráter hidrofóbico da superfície de PTR a base de polimetilmetacrilato (PMMA). O uso de vernizes protéticos à base de metacrilatos tem sido proposto com o intuito de selar os poros e eliminar eventuais imperfeições na superfície dos dispositivos protéticos. Visto que nanopartículas de prata e de zircônia têm potencial antimicrobiano, a incorporação destas aos vernizes protéticos pode agregar benefícios a este material odontológico e, colaborar para o tratamento da EP. Avaliar o efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata (NpsAg) e de zircônia (NpsZr) quando associadas à verniz fotopolimerizável contra biofilmes de *Candida albicans* induzidos *in vitro*. Após o tratamento da superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável com verniz protético incorporado ou não (grupo Ver) com NpsAg ou NpsZr (Ver+Ag ou Ver+Zr), biofilmes de *C. albicans* foram induzidos sobre tais superfícies, durante 24h, 7 e 14 dias. Como controles, foram utilizados corpos de prova que não receberam tratamento (PBS) e corpos de prova tratados com verniz associado à nistatina (Ver+Nist). A atividade microbiana foi avaliada por meio da quantificação do biofilme pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e pelo percentual de redução da atividade metabólica das células fúngicas pelo ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio (XTT). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste *post-hoc* de Tukey HSD. A incorporação de nanopartículas (prata ou zircônia) ao verniz fotopolimerizável resultou em maior redução das UFC/mL do biofilme de *C. albicans* em comparação ao tratamento somente com verniz (grupo Ver) no período inicial de 24 horas. Ainda em comparação ao tratamento com verniz apenas, a incorporação de nanopartículas de prata levou a maior redução da atividade metabólica do biofilme nos períodos de 24 horas e 14 dias, enquanto a incorporação de nanopartículas de zircônia resultou nesta maior redução no período de 7 e 14 dias.

A incorporação de nanopartículas de prata e de zircônia potencializaram o efeito antimicrobiano do verniz fotopolimerizável contra o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável, apresentando efeitos promissores e inovadores para uso temporário na prevenção e tratamento da EP.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Polimetil Metacrilato. Candidíase Bucal. Nanopartículas. Prótese Dentária.

ABSTRACT

Evaluation of the antimicrobial activity of silver and zirconia nanoparticles in a photopolymerizable varnish against *Candida albicans* biofilm

Denture stomatitis (DS) is a multifactorial disease commonly diagnosed in removable complete denture (RCD) users. It frequently affects the upper jaw, being closely associated with microbial biofilm on the RCD base. *Candida spp.* is the main genus of fungi found in this biofilm, with the species *C. albicans* being the most common. Many local factors contribute to biofilm formation and, consequently, to the occurrence of DS, including surface roughness and the hydrophobicity of the RCD surface when made with polymethyl methacrylate (PMMA). The use of methacrylate-based varnishes to seal pores and eliminate wear and tear-associated imperfections on prosthetic device surfaces has been proposed. Since silver and zirconia nanoparticles have antimicrobial potential, their incorporation into prosthetic varnishes may improve this dental material and enhance DS prophylaxis. This study aims to evaluate the antimicrobial effect of silver (NpsAg) and zirconia (NpsZr) nanoparticles embedded in photopolymerizable varnish against *Candida albicans* biofilm formation *in vitro*. Surfaces of thermal polymerizable acrylic resin specimens were prepared without or with (Var group) prosthetic varnish incorporating NpsAg or NpsZr (Var + Ag or Var + Zr). *C. albicans* biofilm formation was induced on these surfaces for 24 hours, seven and 14 days. Controls included specimens that received no treatment (PBS) and specimens treated with varnish associated with nystatin (Var + Nyst). Microbial activity was evaluated by quantification of colony forming units per milliliter (CFU/mL) in formed biofilms, and by the percent reduction in fungal cell metabolic activity measured via colorimetric tetrazolium salt reduction assay (XTT). Results are expressed as means \pm standard deviation and have been subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's HSD *post-hoc* test. Incorporation of nanoparticles (silver or zirconia) into photopolymerizable varnish reduced CFU/mL from recovered *C. albicans* biofilms compared to treatment with varnish alone (Var) in the initial 24-hour period. Incorporation of silver nanoparticles more strongly reduced metabolic activity in biofilms after 24 hours and fourteen days of biofilm development. Incorporation of zirconia nanoparticles enhanced inhibition of biofilm formation at seven and fourteen days. Incorporation of silver and zirconia nanoparticles potentiated

the antimicrobial effect of the photopolymerizable varnish against *C. albicans* biofilm formation on thermal polymerizable acrylic resin surfaces, revealing their promise as innovative agents for use in DS prevention and treatment.

Keywords: *Candida albicans*. Polymethyl Methacrylate. Candidiasis. Nanoparticles. Dental Prosthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima de nistatina contra células planctônicas de <i>Candida albicans</i>	63
Figura 2 -	Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima de nanopartículas de prata (NpsAg) contra células planctônicas de <i>Candida albicans</i>	64
Figura 3 -	Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima de nanopartículas de zircônia (NpsZr) contra células planctônicas de <i>Candida albicans</i>	64
Figura 4 -	Comparação dos grupos PBS, Ver, Ver+Nist, Ver+Ag e Ver+Zr, com relação às unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) do biofilme de <i>C. albicans</i> induzido por 24h, 7 e 14 dias sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável	66
Figura 5 -	Comparação dos grupos PBS, Ver, Ver+Nist, Ver+Ag e Ver+Zr, com relação ao percentual (%) de redução da atividade metabólica do biofilme de <i>C. albicans</i> induzido por 24h, 7 e 14 dias sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do verniz Palaseal®	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Ag	Prata
céls/mL	Células por mililitro
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
DO	Densidade óptica
EP	Estomatite protética
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares (<i>Extracellular polymeric substances</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
h	Horas
Kg	Quilogramas
kgf	Quilograma força
L	Litros
Lm	Limite de medição
MEP	Matriz extracelular polissacarídica
mg	Miligramas
mg/mL	Miligramas por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Micromolar
mm	Milímetros
Nist	Nistatina
nº	Número
µL	Microlitros
nm	Nanometros
Nps	Nanopartículas
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTR	Próteses totais removíveis
Ra	Rugosidade média
Rpm	Rotações por minuto

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UV	Ultravioleta
XTT	Ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio
YEPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>
Zr	Zircônia

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
°C	Graus Celsius
©	Direitos autorais
%	Porcentagem
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	ESTOMATITE PROTÉTICA	31
2.2	FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DO BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	32
2.3	TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA E SUAS LIMITAÇÕES.....	34
2.4	A UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA	39
2.5	VERNIZES PROTÉTICOS NO MANEJO DA ESTOMATITE PROTÉTICA.....	41
3	PROPOSIÇÃO	45
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PELO MÉTODO DE TURKEVICH.....	49
4.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZIRCÔNIA PELO MÉTODO HIDROTERMAL.....	49
4.3	CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA DE RESINA ACRÍLICA	50
4.4	MANIPULAÇÃO DE <i>C. ALBICANS</i> SC5314: OBTENÇÃO DA PRÉ-CULTURA E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	52
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA FRENTE A CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE <i>C. ALBICANS</i>	53
4.6	TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DOS CORPOS DE PROVA DE RESINA ACRÍLICA TERMOPOLIMERIZÁVEL	54
4.7	DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE <i>C. ALBICANS</i> SOBRE A SUPERFÍCIE DE CORPOS DE PROVA.....	55
4.8	QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME DE <i>C. ALBICANS</i> POR MEIO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR MILILITRO (UFC/ML)	56

4.9	QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME FÚNGICO PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO DE REDUÇÃO DE SAIS DE TETRAZÓLIO – XTT.....	57
4.10	ANÁLISE DOS RESULTADOS	59
5	RESULTADOS	63
5.1	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA DAS NANOPARTÍCULAS E DA NISTATINA, FRENTE A CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	63
5.2	QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME FÚNGICO FORMADO SOBRE A SUPERFÍCIE DA RESINA ACRÍLICA TERMOPOLIMERIZÁVEL, PREVIAMENTE TRATADA COM A ASSOCIAÇÃO VERNIZ/NPSAG OU NPSZR, POR MEIO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR MILILITRO (UFC/ML).....	65
5.3	REDUÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME FÚNGICO FORMADO SOBRE A SUPERFÍCIE DA RESINA ACRÍLICA TERMOPOLIMERIZÁVEL, PREVIAMENTE TRATADA COM A ASSOCIAÇÃO VERNIZ/NPSAG OU NPSZR, POR MEIO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DE REDUÇÃO DE SAIS DE TETRAZÓLIO – XTT	66
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	83

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A população brasileira está em trajetória de envelhecimento e, até 2060, o percentual de pessoas com mais de 65 anos no país representará 25,5% da população. Neste mesmo período, a projeção para a expectativa de vida do brasileiro ao nascer é alcançar 77,9 anos para homens e 84,2 anos para mulheres. Assim, espera-se que, em 2039, o número de idosos com mais de 65 anos supere o de crianças com até 14 anos (IBGE, 2018).

Com o aumento da população idosa, é esperada uma elevação na prevalência de doenças e condições de vulnerabilidade, como por exemplo o edentulismo (PELTZER *et al.*, 2014; TYROVOLAS *et al.*, 2016). Nesse contexto, a reabilitação dentária se faz necessária, muitas vezes por meio de próteses removíveis totais e/ou parciais. A resina acrílica termopolimerizável à base de polimetilmetacrilato (PMMA) é o material usado para a produção destas próteses, apresentando inúmeras vantagens como seu baixo custo, facilidade de processamento, biocompatibilidade, alta resistência à flexão e baixa solubilidade em água (ANUSAVICE; SHEN; RAWLS, 2012; LIMÍRIO *et al.*, 2021; ZARB; FENTON, 2012).

No entanto, esse material apresenta desvantagens no que diz respeito às suas propriedades de superfície, como a liberação de monômero de metacrilato de metila residual que afeta sua estabilidade dimensional, levando a deficiências físicas em sua superfície como a rugosidade e porosidade, que podem atuar como reservatórios de microrganismos (AL-FOUZAN; AL-MEIRAD; ALBARRAG, 2017; AWAD; JASSIM, 2012; LIMÍRIO *et al.*, 2021). O polimento deficiente da resina e a ação abrasiva do dentífrico durante a escovação também resultam em rugosidades na superfície interna das próteses removíveis (AL-RIFAIY *et al.*, 2010). Além da rugosidade superficial, a hidrofobicidade e a energia livre da superfície da resina acrílica desempenham papel importante na adesão do biofilme fúngico (BURGERS *et al.*, 2009). Vale ressaltar, ainda, que os fungos *Candida* apresentam uma afinidade pela resina acrílica termopolimerizável devido a interações de atração entre duas superfícies hidrofóbicas, resultando em uma força negativa simultânea (PARK; PERIATHAMBY; LOZA, 2003).

Assim, as próteses removíveis, principalmente as totais superiores, apresentam uma superfície interna vulnerável à adesão e ao desenvolvimento de biofilme microbiano, podendo constituir verdadeiros reservatórios de microrganismos,

em especial se a higienização pelo usuário for inadequada e a prótese permanecer na boca durante toda a noite ao dormir (ADAM; KHAN, 2021). Tais reservatórios apresentam biofilmes de natureza polimicrobiana, com uma predominância por fungos da espécie *Candida spp.*, os quais estão fortemente associados a uma alteração inflamatória na mucosa bucal (que está em contato direto com a superfície contaminada da resina), denominada estomatite protética (EP) (PATTANAİK *et al.*, 2010; ZOMORODIAN *et al.*, 2011).

Neste sentido, muitos fatores locais contribuem para a ocorrência da EP, como o uso contínuo dos dispositivos protéticos, uma higienização bucal precária, a idade e a condição da prótese, o tabagismo e fatores dietéticos (GAD; FOU DA, 2020; GENDREAU; LOEWY, 2011; HANNAH *et al.*, 2017; TAWEECHASUPAPONG *et al.*, 2006). A maioria destes fatores estão relacionados ao desenvolvimento ou manutenção do biofilme, rico em *C. albicans* na superfície interna da resina acrílica das próteses (OKSALA, 1990; SOYSA; ELLEPOLA, 2005; SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2004). Fatores sistêmicos como idade avançada, distúrbios hormonais (como por exemplo a diabetes), uso prolongado de drogas imunossupressoras ou tratamento quimioterápico, também podem colaborar para o desenvolvimento da EP, já que resultam em redução dos mecanismos imunes do hospedeiro (FEIGAL *et al.*, 1991).

Dentre os vários tipos de microrganismos que podem compor esse biofilme que se forma na superfície das próteses removíveis bucais, a *C. albicans* é considerado o principal (ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2017). Acredita-se que esse fungo seja capaz de infectar vários nichos no hospedeiro por apresentar muitos fatores de virulência, além de características da própria espécie que contribuem para a iniciação e desenvolvimento de biofilme sobre as superfícies bióticas e abióticas. Exemplos dessas características são a sua capacidade de sofrer transição morfológica entre as formas de levedura e hifa (dependendo do ambiente), o potencial de expressar adesinas na superfície celular e o de secretar enzimas hidrolíticas (ALEXANDER *et al.*, 2013; NICHOLLS *et al.*, 2011; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). Ainda, a forma micelial dos fungos *Candida spp.*, associada à síntese de matriz exopolissacarídica, aumenta sua atividade patogênica e proporciona maior aderência à resina acrílica e, assim, estabelece o processo inflamatório na mucosa de suporte (BERGAMO *et al.*, 2018).

A *C. albicans* é encontrada de forma comensal na microbiota bucal. No entanto, a redução da resposta imune do hospedeiro ou, ainda, fatores locais que favorecem a sua proliferação, determinam a sua transição de comensal para patógeno, causando inúmeras formas de candidose, as quais variam de formas sistêmicas (mais graves) a formas localizadas, como as candidoses bucais. Considerando a forte relação patogênica entre o fungo *C. albicans* e a EP, essa doença também é considerada uma forma localizada de candidose orofaríngea e está associada à formação de biofilmes (VILA *et al.*, 2020).

Considerando que a rugosidade superficial desempenha um papel importante na adesão do biofilme fúngico, tratamentos ou abordagens complementares que promovam a regularização da superfície interna da base da prótese tornam-se alvos importantes de estudo (BURGERS *et al.*, 2009). Este raciocínio pode ser fortalecido pelo fato de que o tratamento convencional para as infecções por *Candida spp.*, como por exemplo o uso da nistatina e dos azólicos, apresentam desvantagens significativas, embora sejam eficazes no combate ao fungo. Dentre estas desvantagens, pode-se citar o desconforto gastrointestinal (que pode causar náuseas, vômitos e diarreia), bem como efeitos colaterais hepáticos e nefrológicos, alta taxa de recorrência da infecção e a resistência subsequente da *Candida spp.* ao tratamento (LYU *et al.*, 2016; VILA *et al.*, 2020). Além disso, a reincidência de EP após a supressão do tratamento é bastante frequente, tendo sido relatada em cerca de 50% dos casos (VILA *et al.*, 2020).

Vernizes protéticos fotopolimerizáveis à base de metilmetacrilato têm sido utilizados nas bases das próteses totais removíveis (PTR), com o intuito de selar os poros e eliminar eventuais ranhuras pós-acabamento e pós-polimento, diminuindo a adesão microbiana, bem como proporcionando melhores condições de higiene bucal (CAĞAVI *et al.*, 2004; LAZARIN *et al.*, 2012; LAZARIN *et al.*, 2013). Ainda, o uso de tratamentos de superfície, como o de vernizes, pode reduzir a presença de sítios ativos na superfície do polímero, reduzindo sua chance de interação com outras moléculas. Esse processo aumenta a hidrofilia e reduz a aderência de *Candida albicans* em superfícies de resina acrílica (ACOSTA *et al.*, 2020). De acordo com os fabricantes, a aplicação do verniz (ou selante) modifica as propriedades físico-químicas de restaurações provisórias de resina acrílica e de próteses totais, aumentando a lisura superficial, vedando as ranhuras e rugosidades pós-acabamento e polimento, além de diminuir o acúmulo de alimento residual e a adesão/colonização

microbiana por meio de biofilmes, o que proporciona melhores condições de higiene oral aos usuários de próteses totais (EMMANOUIL; KAVOURAS; KEHAGIAS, 2002; CAĞAVI *et al.*, 2004). Segundo Monsenego *et al.* (2000), o verniz melhora, de fato, a macro e a microestrutura da superfície da prótese dentária, entretanto oferece apenas uma discreta redução em relação a adesão de microrganismos, não interferindo efetivamente contra a adesão microbiana e inibição da formação do biofilme (MONSENEGO *et al.*, 2000; NOMURA *et al.*, 2020).

Assim, a incorporação de agentes antimicrobianos no verniz agregaria a esse material um potencial antimicrobiano e antiaderente mais efetivo contra *C. albicans*. Além disso, é importante notar que um verniz funciona como um bom veículo para manter esse agente atuando temporariamente sobre a superfície de resina das próteses removíveis, resultando em uma proposta complementar na terapia e prevenção da EP, em especial para usuários de PTR (COSTA *et al.*, 2022; SHAMSOLKETABI; NILI, 2018).

Neste sentido, os nanomateriais têm representado, para a área odontológica, importantes estratégias antimicrobianas, podendo ser elaborados pelos mais diversos tipos de material, como a prata, ouro, titânio, zircônia, quitosana, óxido de zinco e biopolímeros (PAGONIS *et al.*, 2010; BARROS *et al.*, 2014; ALABDULMOHSEN; SAAD, 2017). Nanopartículas de prata (NpsAg) e zircônia (NpsZr) têm sido empregadas devido às suas significantes e comprovadas atividades antimicrobianas. Especificamente, as NpsAg têm potencial oxidativo, como por exemplo por meio da liberação de prata catiônica, a qual é citotóxica para microrganismos (LEE, *et al.*, 2019; PORENCZUKL *et al.*, 2019), enquanto as superfícies ativas das NpsZrO₂ interagem com os microrganismos, levando-os à morte (FATHIMA; PUGAZHENDHI; VENIS, 2017; JANGRA *et al.*, 2012).

Tendo em vista a possibilidade de encapsulação e a atividade antimicrobiana frente a *C. albicans* das partículas de prata e de zircônia, além da aplicabilidade clínica do verniz sobre a resina acrílica, a incorporação de nanopartículas carregadas com prata ou zircônia a um verniz fotopolimerizável pode representar uma estratégia inovadora e eficaz para o tratamento ou prevenção da EP e/ou infecções causadas por espécies de *Candida spp.*

Nossa hipótese é de que o verniz incorporado com estas nanopartículas, além de melhorar a macro e a microestrutura da superfície da resina acrílica das próteses totais (ação física), atuaria diretamente na morte das células fúngicas (ação biológica),

enquanto a camada de verniz estiver presente. Assim, o material adicionado de nanopartículas antimicrobianas teria o potencial de inibir o desenvolvimento da EP, bem como de possíveis complicações como a deglutição ou a aspiração de fragmentos fúngicos em pacientes imunossuprimidos ou hospitalizados. Com essas vantagens, tal associação poderia proporcionar melhor qualidade de saúde bucal para os usuários de próteses totais bucais.

Assim, por meio deste presente estudo, foram realizados ensaios *in vitro* para analisar o potencial antifúngico de um verniz fotopolimerizável de uso odontológico, sobre a base de próteses totais removíveis, incorporado com nanopartículas de prata ou de zircônia. Os efeitos observados das diferentes nanopartículas foram comparados entre si por meio de métodos estatísticos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA

A estomatite protética é uma doença multifatorial muito frequente em usuários de próteses bucais removíveis, principalmente nas totais superiores. É caracterizada por uma reação inflamatória eritematosa na mucosa bucal que suporta a resina acrílica das próteses removíveis, geralmente associada à proliferação de *Candida albicans* na superfície interna destes dispositivos. Sendo assim, a EP pode ser considerada uma das formas localizadas de candidose orofaríngea, podendo manifestar-se clinicamente como pequenos pontos ou áreas eritematosas a vermelhidão em toda a área chapeável da prótese (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010). O fungo *Candida spp.* é o principal microrganismo encontrado no biofilme sobre a base das PTR de pacientes usuários (GENDREAU e LOEWY, 2011; YIGIT *et al.*, 2011). Dentre as espécies mais prevalentes, a *C. albicans* é a mais observada, seguida das espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (COCO *et al.*, 2008; GENDREAU; LOEWY, 2011; YIGIT *et al.*, 2011).

Newton classificou, em 1962, a EP de acordo com sua gravidade, variando de leve, moderada a alterações intensas nos tecidos moles (GENDREAU; LOEWY, 2011; HANNAH *et al.*, 2017; NEWTON, 1962). O tipo 1 se refere ao quadro de inflamação localizada ou a presença pontual de eritema, sendo mais frequentemente observada em pacientes com razoável higiene bucal e que não removem os dispositivos protéticos à noite. O tipo 2 se trata de uma progressão da doença, ou seja, um quadro de eritema difuso envolvendo parte ou a totalidade da área de sustentação da prótese. Quando a condição é de longa data, os pacientes podem apresentar hiperplasia papilar inflamatória, geralmente em rebordo alveolar e em palato duro, caracterizando o tipo 3 de Newton. É comum que o quadro de EP seja acompanhado de outras doenças, como a presença de úlceras traumáticas, atrofia central da língua e queilite angular. Muitas vezes, os pacientes não sabem que estão com a doença, pois ela pode ser totalmente assintomática e, por esse motivo, é geralmente um achado incidental em consulta odontológica, pela presença de inflamação ou inchaço dos tecidos regular (GENDREAU; LOEWY, 2011; HANNAH *et al.*, 2017; NEWTON, 1962). Alguns portadores podem apresentar sinais como prurido, sensação de queimação ou dor (BUDTZ-JORGENSEN, 1974).

Muitos estudos sugerem que até dois terços dos usuários de PTR podem apresentar EP (ARENDORF; WALKER, 1987; WILSON, 1998; REICHART, 2000). Atualmente, considera-se que a EP seja uma doença multifatorial e possui múltiplos fatores associados que contribuem para o seu surgimento (GAD; FOU DA, 2020). A deficiente higienização oral e dos dispositivos protéticos, o uso contínuo das próteses e o tipo de material da superfície da prótese são os fatores etiológicos predominantes, por permitirem a adesão e proliferação de microrganismos, incluindo fungos *Candida spp* (GAD; FOU DA, 2020; GENDREAU; LOEWY, 2011). No entanto, outros fatores podem influenciar no curso da doença, como a condição sistêmica do paciente, a presença de xerostomia ou diabetes, a idade da prótese, tabagismo e fatores dietéticos (TAWEECHAI SUPAPONG *et al.*, 2006; SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2006; SOYSA; ELLEPOLA, 2005).

Neste contexto, a susceptibilidade do hospedeiro também desempenha um importante papel na patogenicidade da espécie *Candida spp*. Atualmente, com a tendência de envelhecimento da população em todo o planeta, novas e mais complexas condições surgem, desafiando os tratamentos existentes. Pacientes submetidos a terapias imunossupressoras, corticoterapia ou quimioterapia, por exemplo, são mais susceptíveis à proliferação de *Candida spp*. e ao desenvolvimento do biofilme microbiano, com predominância de fungos sobre a superfície interna de PTR (HANNAH *et al.*, 2017).

2.2 FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DO BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS*

A *C. albicans* é um fungo polimórfico, ou seja, possui a capacidade de formar hifas e leveduras alternadamente, podendo, assim, penetrar e invadir os tecidos do hospedeiro quando na forma de hifa. Existem, no entanto, evidências que sugerem que a invasão de *Candida spp*. nos tecidos, pode ser secundária a trauma em tecidos moles e a presença de inflamação (EMAMI *et al.*, 2008; KABAWAT *et al.*, 2014). Além disso, é o microrganismo comensal mais prevalente em humanos, com potencial de colonizar mucosas e superfícies internas de PTR, podendo resultar no surgimento da EP (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010; GLEIZNYS; ZDANAVIČIENĖ; ŽILINSKAS, 2015).

O fungo *C. albicans* possui a capacidade de desenvolver biofilmes que tornam mais forte a sua aderência às superfícies, aumentando sua resistência aos

antimicrobianos (FORSBERG *et al.*, 2019). Neste sentido, a capacidade de adesão de *Candida* à mucosa bucal e ao acrílico da superfície das PTR é um fator importante na sua resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro, visto que os dispositivos protéticos atuam como reservatórios protetores que impedem que o fungo seja deslocado pela saliva ou por outras forças de deslocamento (RAMAGE *et al.*, 2004; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006). O PMMA termopolimerizável é o material mais utilizado na confecção de PTR e, devido ao seu método de acrilização por meio de calor, o aumento do número de poros na superfície da prótese é comum, contribuindo para a adesão microbiana (SINGH; PALASKAR; MITTAL, 2013).

Os biofilmes, por sua vez, são estruturas tridimensionais complexas compostas por uma comunidade de células microbianas de uma mesma espécie ou de espécies mistas ligadas ao tecido do hospedeiro ou a superfícies abióticas, embutida em uma matriz extracelular polissacarídica (MEP) que fornece proteção aos microrganismos (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; GHANNOUM *et al.*, 2015). O processo de desenvolvimento do biofilme ocorre em etapas sequenciais que duram entre 24 e 48 horas, o qual pode ser dividido em 4 etapas: adesão, proliferação, maturação e dispersão do fungo (ŘIČICOVÁ *et al.*, 2010; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; LOHSE *et al.*, 2018).

Na fase de adesão, as células de levedura isoladas aderem ao substrato formando uma camada basal de células. Na proliferação, há a formação de filamentos, onde as células conseguem se desenvolver em hifas filamentosas, ou seja, mudam sua morfologia, invadindo a mucosa do hospedeiro ou superfícies abióticas, como as superfícies plásticas ou poliméricas. Em seguida, fungos *C. albicans* secretam enzimas hidrolíticas, como proteinases, hemolisinas e fosfolipases, promovendo uma invasão do tecido do hospedeiro ou de outros substratos sólidos (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; TSUI, KONG, JABRA-RIZK, 2016).

Durante a maturação, a produção de hifas é acompanhada pela secreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) complexas que estão ligadas à resistência do biofilme aos antifúngicos, pois podem bloquear a difusão desses fármacos (TAFF *et al.*, 2013). Essa matriz do biofilme é melhor desenvolvida durante e após o estágio de maturação, que por sua vez atua como uma barreira física de proteção contra o meio ambiente, proporcionando integridade estrutural ao biofilme (NOBILE; JOHNSON, 2015; GULATI; NOBILE, 2016). Por fim, na fase de dispersão, as células da levedura são liberadas do biofilme maduro, podendo se espalhar para

locais distantes, iniciando um novo ciclo de formação de biofilme. Nessa fase final, as células recém-liberadas são capazes não apenas de iniciar novos ciclos de formação de biofilme, mas também de adentrar a corrente sanguínea e estabelecer novos focos de infecção (TOURNU; VAN DIJCK, 2012).

Assim sendo, é possível afirmar que a microbiologia da EP é ainda mais complexa quando se considera que mais de 30 tipos de microrganismos já foram identificados como exclusivos dos biofilmes da EP, sendo a espécie *Candida spp.* a predominante (HANNAH *et al.*, 2017). Muitos estudos têm realizado esforços para avaliar as interações entre *C. albicans* e bactérias comensais em biofilmes da cavidade oral. A presença de *Streptococcus mutans*, por exemplo, aumenta significativamente a virulência de ambas as espécies *in vivo*, resultando em severas lesões de cárie (FALSETTA *et al.*, 2014). *Staphylococcus aureus* podem invadir e se disseminar pelos tecidos dos hospedeiros por meio da sua aderência à forma de hifa de *C. albicans* (SCHLECHT *et al.*, 2015).

Por outro lado, a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inibe a formação de biofilme de *C. albicans* via *quórum sensing*, enquanto o contato com *Fusobacterium nucleatum* inibe o crescimento do fungo e a morfogênese de suas hifas (BACHTIAR *et al.*, 2014; BOR *et al.*, 2016). Além disso, outras espécies de microrganismos, como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, também podem apresentar efeitos inibitórios na morfogênese das hifas de *C. albicans*. Ainda, o uso de *Lactobacillus*, por exemplo, apresenta efeito probiótico na cavidade oral, podendo restaurar a composição normal da microbiota bucal (NIKAWA *et al.*, 2011; KRAFT-BODI *et al.*, 2015; ISHIKAWA *et al.*, 2015).

2.3 TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA E SUAS LIMITAÇÕES

Muitas melhorias têm sido propostas para inibir e controlar a EP, como a aplicação tópica de agentes antifúngicos, a modificação da superfície da base da prótese e a incorporação de agentes antimicrobianos no interior da resina acrílica (GAD; FOUUDA, 2020). Uma das intervenções mais comuns para o tratamento da EP é o uso de agentes antifúngicos (GEBREMEDHIN *et al.* 2014; DAVIES *et al.*, 2016). No entanto, embora sejam intervenções efetivas, apresentam efeitos adversos ao paciente e contribuem para o surgimento de cepas resistentes (BAKHSHI *et al.*, 2012; TSUTSUMI; TAKAKUDA; WAKABAYASHI, 2016). Além disso, no caso de

antifúngicos tópicos, a efetividade mantém-se apenas por um curto período, em função dos efeitos do constante fluxo salivar (BAKSHI *et al.*, 2012; MARTINS; GONTIJO, 2017). Atualmente, embora se conheça uma diversa variedade de antibióticos disponíveis no mercado, apenas quatro classes de antifúngicos são utilizadas para o tratamento da maioria das infecções fúngicas: os derivados de azóis (como por exemplo o fluconazol, clotrimazol, cetoconazol e itraconazol), polienos (ex: nistatina e anfotericina B), equinocandinas (ex: caspofungina e micafungina) e os análogos de nucleosídeo, esses últimos menos utilizados para o tratamento da EP (GULATI; NOBILE, 2016).

Os derivados de azóis agem por meio da ligação do grupo nitrogênio ao anel azólico do grupo heme da proteína-alvo, bloqueando a desmetilação do lanosterol C-14, levando à substituição de esteróis metilados na membrana. A inibição dessa enzima resulta na redução do conteúdo de ergosterol na membrana plasmática e, conseqüentemente, no acúmulo de intermediários tóxicos metilados que causam, por sua vez, interrupção da função da membrana celular fúngica, inibido seu crescimento e, em alguns casos, levando à morte celular (ODDS; BROWN; GOW, 2003; XIAO *et al.*, 2004; AKINS, 2005). O principal mecanismo de resistência aos azóis é a superexpressão de bombas de efluxo da membrana celular, que agem reduzindo o acúmulo de azóis no interior das células de levedura, devido, por exemplo, a superexpressão dos genes CDR1 e CDR2 (RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2008; PRASAD *et al.*, 2015). A resistência ocorre quando há alterações na morfologia do microrganismo, de modo que os antifúngicos convencionais são incapazes de realizar a lise fúngica (PEREIRA; FONTENELLE, 2020). Em células planctônicas, as bombas de efluxo são tipicamente reguladas em resposta a antifúngicos. No entanto, em biofilmes, elas são reguladas positivamente nas primeiras horas de adesão e permanecem reguladas durante todo o desenvolvimento do biofilme, mesmo na ausência de antifúngicos (NOBILE *et al.*, 2015; NOBILE; JOHNSON, 2015).

Os polienos agem prejudicando o ergosterol na membrana celular dos fungos, onde adentram na bicamada lipídica e formam poros que prejudicam a integridade da membrana plasmática, permitindo a difusão de moléculas e resultando em morte celular (PERMÁN; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009). Embora a resistência à anfotericina B seja bastante incomum, em especial entre os isolados de *C. albicans*, está relacionada a mutações do gene ERG3, o que diminui a concentração de ergosterol na membrana plasmática fúngica (KELLY *et al.*, 1997). No entanto, apesar

de seu efeito potente contra *C. albicans*, o uso da anfotericina B é limitado devido a sua nefrotoxicidade (PAPPAS *et al.*, 2009).

As equinocandinas são compostos fungicidas comumente utilizados contra leveduras. Elas agem inibindo um complexo enzimático na membrana plasmática das células fúngicas, chamado β -1,3-glucana sintase, essencial para os fungos, pois é um dos principais componentes da parede celular (AGARWAL *et al.*, 2003; PERLIN *et al.*, 2007). A resistência de *C. albicans* às equinocandinas tem sido atribuída a mutações nos genes Fks1 e Fks2, que são subunidades catalíticas da β -1,3-glucana sintase, dentre outros genes (KRITIKOS *et al.*, 2018; PFALLER *et al.*, 2019).

Uma das maiores limitações do uso de antifúngicos no tratamento da EP é o seu potencial de selecionar cepas resistentes de *C. albicans* e se tornar, ao longo do tempo, pouco ou nada eficaz. O fenômeno de resistência clínica do fungo aos antifúngicos ocorre quando o microrganismo deixa de ser sensível a um antifúngico *in vivo* devido à falta de sucesso terapêutico (EL-AZIZI, FARAG, KHARDORI, 2015). O uso prolongado de antifúngicos é o principal motivo que leva à resistência de *C. albicans* aos antifúngicos (DAWSON; INTAPA; JABRA-RIZK, 2011).

Três mecanismos principais – dependentes do modo de ação do fármaco - são utilizados para explicar a resistência aos antifúngicos: 1. a redução do acúmulo da droga no meio intracelular; 2. a diminuição da afinidade e/ou processamento da droga pelo fungo e; 3. a redução do efeito da droga propriamente dita. A modificação de atividades enzimáticas, mutações na codificação genética e a atuação de bombas de efluxo nos fungos são outros mecanismos conhecidos (KANAFANI; PERFECT, 2008; PERLIN, 2009; PERMÁN; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Neste contexto, a resistência de *C. albicans* aos antifúngicos é multifatorial e mecanicamente complexa. No entanto, é possível apontar ainda três fatores principais relacionados especificadamente aos fungos: 1. a regulação positiva das bombas de efluxo; 2. a presença de matriz extracelular e; 3. a existência de células metabolicamente inativas, também chamadas de “persistentes”. Esses mecanismos podem, por exemplo, tornar os derivados azólicos e os polienos ineficazes contra biofilmes de *C. albicans*, limitando, ainda, outros fármacos que podem ser usados para o tratamento dessas infecções (GULATI; NOBILE, 2016).

O uso de alternativas à administração de agentes antifúngicos, como o de extratos naturais com algum potencial antimicrobiano, tem sido proposto para

combater a EP. Estes extratos são produtos mais baratos, menos tóxicos e com menor potencial de induzir a resistência microbiana (ALAVARCE *et al.*, 2015). Extratos de plantas, como o da *Streblus asper*, *Ricinus communis* e *Equisetum giganteum*, bem como de outros agentes naturais, como própolis, apresentam propriedades antimicrobianas, como a capacidade de alteração da parede celular ou do fenótipo do fungo, colaborando para a redução da quantidade de *C. albicans* aderida na superfície das PTR. Além disso, estes extratos têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios (TAWEECHAISUPAPONG *et al.*, 2006; PINELLI *et al.*, 2013; PINA *et al.*, 2017; AL-DWAIRI; AL-QURAN; AL-OMARI, 2012).

O uso de agentes de limpeza é outro método utilizado para o controle da EP, tratando-se, portanto, de uma alternativa versátil, uma vez que estão disponíveis para os mais diversos métodos de uso e/ou aplicação, como por exemplo para a imersão dos dispositivos protéticos (GORNITSKY *et al.*, 2002; ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2001). O uso do perborato de sódio, por exemplo, é eficaz quando utilizado diariamente na concentração de 3,8% por 10 minutos, mas requer cautela no seu uso (GORNITSKY *et al.*, 2002). Já o uso do hipoclorito de sódio a 0,5% por 10 minutos por dia contribui para a eliminação do biofilme presente nos dispositivos protéticos, mas pode causar corrosão do metal (se presente) e irritação da pele e das mucosas (BARNABÉ *et al.*, 2004). A utilização do bicarbonato de sódio a 5%, por sua vez, apresenta efeitos antifúngicos, enquanto o uso diário do digluconato de clorexidina a 0,12% na forma de bochecho exibe excelente ação antimicrobiana (DE SOUSA *et al.*, 2009; ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2001).

Em contraste, o sucesso dos agentes de limpeza depende do uso contínuo e das concentrações adequadas, respeitando as orientações de preparo e o tempo de imersão (AL-THOBITY *et al.*, 2019). Além disso, muitos estudos têm relatado que o uso desses agentes aumenta a rugosidade superficial da resina da base das próteses, aumentando o acúmulo de biofilme microbiano. Somado a isso, há evidências de que estes agentes podem causar mudanças na cor da resina e uma redução na resistência à flexão desse material, bem como irritação, efeitos citotóxicos leves e sensação de queimação na mucosa bucal (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2001; AL-THOBITY *et al.*, 2019; PORWAL *et al.*, 2017).

Considerando que a rugosidade superficial interna das PTR representa um dos fatores principais que favorecem a adesão de *C. albicans* e a posterior formação de biofilme microbiano, o uso de tecnologias para revestir a superfície da base da prótese

tem sido sugerido para reduzir a adesão fúngica (WALTIMO; VALLITTU; HAAPASALO, 2001; ZAMPERINI *et al.*, 2010; ALI; ALHARBI; SURESH, 2013; YODMONGKOL *et al.*, 2014). Evidências sugerem que, por exemplo, o uso de 2-octil cianocrilato e de nanocompósito de silano (SiO_2) sobre a base da prótese proporciona menor energia de superfície e maior lisura superficial, reduzindo a adesão de *C. albicans* devido ao aumento da hidrofiliabilidade (ALI; ALHARBI; SURESH, 2013; YODMONGKOL *et al.*, 2014).

Já o uso de dióxido de titânio (TiO_2) e de revestimentos poliméricos, como o parileno, podem apresentar efeitos contra a adesão fúngica (ZHOU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2008; TSUJI *et al.*, 2016). Neste contexto, o uso de revestimentos pode, de fato, alterar as características de superfície da base das PTR, diminuindo a adesão de *C. albicans* e a formação de biofilme. No entanto, mais estudos são necessários a fim de se determinar a biocompatibilidade desses revestimentos, assim como sua durabilidade e resistência à ação química e física relativas aos procedimentos de limpeza mecânica desses dispositivos protéticos (GAD; FOUUDA, 2020).

A chamada resina antimicrobiana, resultada da incorporação de carga e de agentes antimicrobianos nanoparticulados à resina acrílica, tem sido sugerida para a eliminação da formação do biofilme e da adesão microbiana como alternativa complementar aos métodos mecânicos utilizados para a limpeza das PTR (DA SILVA *et al.*, 2008a). Neste contexto, já que a adesão microbiana é aumentada devido a natureza hidrofóbica da base da resina das PTR associada a interações eletrostáticas, a incorporação de agentes com carga tem sido sugerida para evitar esse processo (NEWTON, 1962; TOTU *et al.*, 2017).

Preenchedores à base de ionômero de vidro, como aqueles fluoretados, atuam como liberadores de fluoretos, enquanto o S-PRG, por outro lado, apresenta efeitos contra *C. albicans* por ser capaz de liberar 6 tipos de íons: Na^+ , Sr^{2+} , SiO_3^{-2} , Al^{3+} , Bo_3^- e F^- . O ácido bórico, por exemplo, é capaz de desestabilizar a membrana plasmática da *C. albicans* pela diminuição do seu ergosterol quando na forma de hifa, causando a desintegração do seu citoesqueleto. O fluoreto de sódio (NaF) apresenta atividade fungicida devido à interação de flúor com componentes da membrana plasmática fúngica quando na forma de levedura. Já a presença do elemento sódio pode criar estresse osmótico, reduzindo o tempo de multiplicação celular de *C. albicans* e podendo, inclusive, levar a morte dos fungos (TSUTSUMI; TAKAKUDA; WAKABAYASHI, 2016; AL-BAKRI *et al.*, 2014).

2.4 A UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA

As infecções fúngicas relacionadas ao biofilme são mais difíceis de controlar por meio de tratamentos padrões. Prova disso, é o fato de que os biofilmes de *Candida spp.*, por exemplo, são mais resistentes aos azóis do que as células planctônicas em até 1000x (PAPPAS *et al.*, 2009; KUHN *et al.*, 2002). Por isso, o uso de nanomateriais tem recebido atenção como uma forte alternativa ou alternativa complementar ao uso de antimicrobianos (AHAMAD *et al.*, 2022). O uso de NpsAg, por exemplo, apresenta uma significativa ação antimicrobiana por meio da inibição da replicação celular, por atuar como um transportador de espécies reativas de oxigênio (EROs) e por liberá-los próximo à superfície celular, mas também pela redução da hidrofobicidade da superfície celular e da capacidade de algumas espécies fúngicas de formar hifas e leveduras alternadamente (HASHIM *et al.*, 2020; AHAMAD *et al.*, 2022).

Os nanomateriais são partículas sólidas com diâmetro entre 1 e 100nm, que apresentam resultados promissores em terapias antimicrobianas por causa das suas propriedades físico-químicas próprias (SAAFAN *et al.*, 2018). Seus tamanhos ultrapequenos, sua grande relação superfície-massa e sua maior reatividade química são exemplos dessas propriedades que permitem uma interação com a superfície carregada dos microrganismos, gerando um efeito antimicrobiano (CAO *et al.*, 2018). Além disso, quando combinadas com polímeros e/ou utilizadas como revestimento em superfície de biomateriais, demonstraram propriedades antimicrobianas superiores ao uso isolado na cavidade oral (SAAFAN *et al.*, 2018). Evidências atuais mostram que nanopartículas menores possuem capacidade de liberar mais íons, obtendo, assim, um efeito antimicrobiano maior e, em especial, superior em microrganismos resistentes a drogas, quando comparadas a partículas maiores (KASRAEI *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2018; CAO *et al.*, 2017). Por isso, sua aplicação em odontologia pode ser particularmente vantajosa (SONG; GE, 2019).

O emprego de NpsAg tem sido amplamente proposto para o controle da EP. Quando confrontadas contra biofilmes de *Candida spp.* as NpsAg inibiram o crescimento do biofilme gradualmente em relação ao aumento de sua concentração utilizada, enquanto seu uso em biofilmes já maduros resultou na interrupção do crescimento do biofilme (AHAMAD *et al.*, 2022). A incorporação de NpsAg na resina

acrílica utilizada na confecção de PTR, por exemplo, melhorou as propriedades físicas e mecânicas do PMMA, melhorando sua condutividade térmica e sua resistência à compressão, além de promover maior atividade antifúngica, em especial contra *C. glabrata* (HAMEDIRAD *et al.*, 2014; GHAFARI; RAD; EZZATI, 2014; DE CASTRO *et al.*, 2016). Por outro lado, essa incorporação pode aumentar a dureza superficial, causar descoloração da resina e, ainda, promover uma diminuição da resistência à flexão e ao impacto (ZHANG *et al.*, 2017).

Adicionalmente a isso, quando NpsAg são incorporadas à resina, possuem a capacidade de liberar cátions Ag^+ que interagem com componentes citoplasmáticos e com os ácidos nucleicos da célula fúngica, inibindo a ação das enzimas da cadeia respiratória, interferindo, conseqüentemente, na permeabilidade da membrana plasmática (HAMEDIRAD *et al.*, 2014; DE CASTRO *et al.*, 2016). Por serem sensíveis ao oxigênio, as NpsAg convertem o oxigênio em oxigênio ativo por meio de reações catalíticas, causando danos estruturais aos microrganismos (LI *et al.*, 2016; NAM; LEE; LEE, 2012; SUGANYA *et al.*, 2014).

As nanopartículas de zircônia, assim como as NpsAg, apresentam efeito antifúngico contra *C. albicans*, com o diferencial de apresentarem esse efeito a longo prazo (HAMID *et al.*, 2021; GOWRI, GANDHI, SUNDRARAJAN, 2014; JANGRA *et al.*, 2012). Sua ação antifúngica se dá pela deformação do fungo quando na forma de hifa, resultando na interrupção da função celular (JANGRA *et al.*, 2012; VEERAAPANDIAN; SAWANT; DOBLE, 2012; GAD *et al.*, 2022). Estudos recentes mostram que, quando incorporadas à resina acrílica, melhoraram significativamente a resistência desse material à tração, afetando negativamente, no entanto, a rugosidade da superfície e a translucidez da resina acrílica (GAD *et al.*, 2018).

Outros nanomateriais têm sido propostos contra a formação de biofilme fúngico. As nanopartículas de dióxido de titânio ($NpsTiO_2$), por exemplo, apresentam efeito antimicrobiano por apresentar propriedades fotocatalíticas na presença de fótons com comprimento de onda inferior a 388nm, resultando na formação de radicais livres que reagem com materiais orgânicos da célula, causando sua degradação. Além disso, é capaz de desativar enzimas celulares, resultando no surgimento de lacunas nas paredes celulares, levando à morte celular (SAWADA *et al.*, 2014; AL-BAKRI *et al.*, 2014; KAMIJO *et al.*, 2009; TOTU *et al.*, 2017). No entanto, suas propriedades antimicrobianas são significantes apenas quando em altas concentrações, o que pode enfraquecer a resina (TSUJI *et al.*, 2016). Já o efeito antimicrobiano de nanopartículas

de zinco se deve ao seu acúmulo no citoplasma das células microbianas, à produção de EROs e à dissociação de íons de zinco (GAD; ABUALSAUD, 2019).

2.5 VERNIZES PROTÉTICOS NO MANEJO DA ESTOMATITE PROTÉTICA

As propriedades de superfície do material usado para a confecção da base das próteses, como a rugosidade superficial e a dureza, podem contribuir significativamente para a incidência da EP (PINTO *et al.*, 2008; TAWEECHASUPAPONG *et al.*, 2006). Um material com alta hidrofobicidade e dureza superficial, como a resina acrílica à base de PMMA, por exemplo, favorece a adesão e proliferação de *C. albicans* (GAD; FOU DA, 2020). Nesse sentido, a modificação da topografia e das propriedades físico-químicas das superfícies das PTR são de grande interesse para a indústria biomédica (KARAM *et al.*, 2013).

Com o objetivo de evitar a colonização por *Candida spp.* na base das PTR e, conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento da EP, modificações na superfície do PMMA têm sido propostas a fim de se aumentar a molhabilidade e diminuir a energia de superfície desse material (LAZARIN *et al.*, 2012; LAZARIN *et al.*, 2013; IZUMIDA *et al.*, 2014; YODMONGKOL *et al.*, 2014). Os processos tecnológicos utilizados para alterar as propriedades físico-químicas da superfície das PTR compreendem aqueles em que uma camada de um novo material é aplicada na superfície da resina ou o próprio PMMA é alterado ou incorporado por outros materiais ou substâncias (MANDRACCI *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o uso de revestimentos fotopolimerizáveis a base de metilmetacrilato tem sido preconizado com o objetivo de selar os poros da superfície da resina e eliminar eventuais ranhuras pós-acabamento e pós-polimento, diminuindo a adesão microbiana (LAZARIN *et al.*, 2013; IZUMIDA *et al.*, 2014; YODMONGKOL *et al.*, 2014). Estudos mostram que os vernizes a base de sultobetáina metacrilato e 3-hidroxipropil metacrilato, por exemplo, reduziram consideravelmente a adesão de *C. albicans* na superfície da resina acrílica termopolimerizável e apresentaram potencial de prevenir o acúmulo desse microrganismo sobre o dispositivo protético por aumentar a suavidade da superfície, exercendo, ainda, algum papel de resistência à abrasão (LAZARIN *et al.*, 2013; URAIVICHAIKUL; BOONSIRI; WATTANASIRMKIT, 2020).

Palaseal[®] é o nome comercial de um produto à base de metacrilatos criado para ser aplicado sobre a superfície de materiais utilizados na confecção de próteses dentárias removíveis, como o PMMA e, até mesmo, de coroas provisórias. Os metacrilatos são uma família de monômeros utilizados como materiais de vedação devido à sua capacidade de gerar uma camada de proteção sobre diversas superfícies. De acordo com o fabricante, esse verniz possui a capacidade de formar uma película de espessura uniforme que é compatível e estável no meio bucal. Além disso, apresenta alta dureza superficial e resistência à abrasão, o que torna possível a obtenção de uma superfície lisa em próteses à base de PMMA (URAVICHAIKUL; BOONSIRI; WATTANASIRMKIT, 2020). Seus componentes são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do verniz Palaseal[®]

Verniz	Componentes
Palaseal [®]	<i>Organic polymers (polypara-xylylenes);</i> <i>Methyl methacrylate 25-50%;</i> <i>Tris(2-hydroxyethyl)-isocyanurat-triacrylate 25-50%,</i> <i>Oligotriacrylate 5-10%;</i> <i>Propoxylated esters with acrylic acid 5-10%;</i> <i>Diphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide 0-5%</i> <i>polyxyloxane hexaacrylate <1%.</i>

Fonte: Uraivichaikul; Boonsiri; Wattanasirmit (2020)

Por ser transparente quando aplicado, o uso do Palaseal[®] não altera a cor dos componentes da prótese e alguns autores, inclusive, relatam que a superfície lisa obtida com sua aplicação evita danos mecânicos na língua e nas mucosas (URAVICHAIKUL; BOONSIRI; WATTANASIRMKIT, 2020; BERTRAND *et al.*, 2000). Embora existam poucas evidências sobre o uso desse material como revestimento para próteses intraorais, estudos recentes mostram que o uso desse revestimento proporciona uma rugosidade superficial superior ao limiar de acúmulo de placa (KOROGLU *et al.*, 2016; SAHIN *et al.*, 2016).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata e de zircônia quando associadas à verniz fotopolimerizável contra biofilmes de *Candida albicans*, em superfície de resina acrílica termopolimerizável.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar o biofilme de *C. albicans* induzido *in vitro* por 24 horas, 7 e 14 dias sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, previamente tratados ou não com a associação verniz/nanopartículas (NpsAg ou NpsZr), por meio da contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL);

Avaliar o percentual de redução do biofilme de *C. albicans* induzido *in vitro* por 24 horas, 7 e 14 dias, sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, previamente tratados ou não com a associação verniz/nanopartículas (NpsAg ou NpsZr), por meio da atividade metabólica das células viáveis, usando o ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio (XTT).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PELO MÉTODO DE TURKEVICH

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Cromatografia e Analítica (UNESP/Bauru – Departamento de Química) seguindo o modelo de outros estudos, mas com algumas modificações, sob a supervisão do Prof. Dr. Fenelon Martinho Lima Pontes. As nanopartículas de Ag foram obtidas pelo método de Turkevich, partindo de uma solução de citrato de sódio 10mM e uma solução de AgNO₃ 4mM (BLOMMAERTS *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2020).

Inicialmente, 60mL da solução de AgNO₃ 4mM foram aquecidos a 80°C e após atingir esta temperatura, 6mL da solução de citrato de sódio 10mM foram adicionados gota a gota sob agitação magnética. Após alguns minutos, a formação das NpsAg foi verificada por meio da alteração da cor da solução: de incolor para uma cor dourada clara (BLOMMAERTS *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2020; WUITHSCHICK *et al.*, 2015). O aquecimento foi desligado e a solução foi resfriada naturalmente até a temperatura ambiente. A confirmação da formação das NpsAg foi realizada pela análise UV-Vis.

4.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZIRCÔNIA PELO MÉTODO HIDROTERMAL

Esta etapa foi também realizada no Laboratório de Cromatografia e Analítica (UNESP/Bauru – Departamento de Química) sob a supervisão do Prof. Dr. Fenelon Martinho Lima Pontes a partir dos métodos de Behbahani *et al.* (2012), Machmudah *et al.* (2014) e Sagadevan *et al.* (2016), com algumas modificações (BEHBAHANI; ROWSHANZAMIRA; ESMAEILIFAR, 2012; MACHMUDAH *et al.*, 2014). As nanopartículas de ZrO₂ foram sintetizadas a partir de um percussivo organometálico (butóxido de zircônio) e um agente oxidante (peróxido de hidrogênio), com posterior tratamento hidrotérmico a 200°C por 1 hora. O processo ocorreu em duas etapas:

Etapa 1 - 500µL de butóxido de zircônio (Zr[(OCH₂)₃CH₃]⁴ - Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, EUA) foram adicionados a 30mL de água destilada e 10mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Synth), e mantidos sob agitação magnética por 24h.

Etapa 2 - Em seguida, a solução reacional foi adicionada ao vaso reacional e o volume completado para 100mL com água destilada. Após, o vaso reacional foi acoplado ao reator hidrotérmico para tratamento a 200°C por 1h.

Após o tratamento hidrotérmico, as amostras foram lavadas três vezes com água destilada. Este procedimento visou eliminar os subprodutos da reação e aumentar a precipitação de óxidos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3400rpm em centrífuga (Quimis, Modelo Q222T2) e secas a 80°C em estufa (Nova Ethics) por 4h (SAGADEVAN; PODDER; DAS, 2016). A confirmação das NpsZr foi realizada pela análise UV-Vis.

4.3 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA DE RESINA ACRÍLICA

Para esta avaliação, 90 espécimes (corpos de prova) de resina acrílica termopolimerizável foram confeccionados, os quais foram inicialmente obtidos a partir de padrões de silicone de condensação, de uso laboratorial Zetalabor (Zhermack, Baia, Polesine, Rovigo, Itália). Esses padrões foram confeccionados a partir de uma matriz em madeira de formato retangular medindo 10 x 10 x 5 mm, a qual foi preenchida com silicone Zetalabor e prensada entre duas placas de vidro (JON Com. de produtos odontológicos Ltda) previamente isoladas com vaselina sólida (Hemafarma Com. e Ind. Farmacêutica Ltda), sob peso de 5kg, por aproximadamente 10 minutos.

Em seguida, os padrões de silicone foram removidos da matriz e os excessos cortados com auxílio de uma lâmina de bisturi e incluídos em muflas de latão polido com pino nº6 (Mac Artigos odontológicos e prótese Ind. e Com. Ltda), anteriormente isoladas com vaselina sólida. Em seguida, as muflas metálicas foram preenchidas com gesso pedra tipo III (Vigodent S/A Ind. e Com.), manipulado e espatulado conforme orientações do fabricante, em cuba de borracha (Dentalbrand Comercial) com espátula para gesso (Indusbello Ind. de Instr. Odontológicos), sob vibração.

Após a polimerização, os padrões de silicone foram colocados sobre o gesso e uma nova camada deste material foi colocada entre eles, a fim de fixá-los na mufla. Após o tempo de polimerização da segunda camada, vaselina sólida foi aplicada em toda a superfície. A contra-mufla também recebeu uma camada de vaselina sólida nas suas superfícies internas e, posteriormente, foi posicionada e devidamente preenchida com gesso pedra tipo III.

As muflas permaneceram na prensa hidráulica (VH Equipamentos Médicos Odont. Acess. Ltda) com 0,5Kgf de pressão por 1 hora e, em seguida, foram abertas para a remoção das matrizes de silicone e realização do exame do molde no gesso, a fim de verificar a presença de bolhas. Para prensagem, foi utilizada a resina acrílica termopolimerizável de cor rosa Lucitone 550 (*Dentsply International* INC), a qual foi homogeneizada com auxílio de uma espátula nº 31 (SS White Art. Dentários Ltda) em recipiente de vidro (Paladon, Pr. Ind. e Comércio de produtos odontológicos), utilizando-se a proporção de 21g de pó para 10mL de líquido, conforme orientações do fabricante. O interior dos moldes de gesso foi isolado com isolante para resina acrílica (S.S. White Artigos Dentários) com auxílio de um pincel de pelo de marta (Condor S.A.) e preenchido com a resina acrílica na fase plástica.

A base da mufla foi coberta com uma folha de papel celofane e fechada com a sua respectiva porção superior para ser prensada em prensa hidráulica sob pressão inicial de 0,5Kgf. No momento em que o ponteiro da prensa hidráulica se apresentou estável, a pressão foi aumentada para 1Kgf e, por fim, até atingir 1,5Kgf. Após a estabilização do ponteiro em 1,5Kgf e escoamento completo do excesso da resina acrílica, a mufla foi novamente aberta, o papel celofane removido e a película de resina acrílica excedente eliminada com o auxílio de uma espátula Lecron (S.S. White Art. Dentários Ltda). A mufla foi novamente fechada e levada para prensa hidráulica sob pressão de 1,5Kgf durante 30 minutos.

Decorrido esse período, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável (Metal Vander Aparelhos para Ortodontia) passível de ser utilizada em polimerizadoras digitais e levada em água à polimerizadora microprocessada digital, modelo banho maria, onde se procedeu a termopolimerização com a seguinte programação: a temperatura da água foi elevada até 73°C e mantida estável durante 90 minutos; em seguida, foi aumentada até atingir 100°C, que foi mantida por mais 30 minutos (PAVARINA *et al.*, 2005).

Após o período de polimerização dos corpos de prova, as muflas foram removidas da polimerizadora microprocessada digital e deixadas sobre a bancada para resfriar por um período de aproximadamente 5 horas. Após o resfriamento completo, procedeu-se a demuflagem dos corpos de prova e os excessos (rebarbas) de resina foram desgastados com o auxílio de uma lixa d'água na granulação 80 (Norton Abrasivos) em politriz circular (Struers-Panambra) em baixa velocidade, sob refrigeração.

Para as leituras de rugosidade superficial foi utilizado o aparelho rugosímetro Hommel Tester T 1000 basic (*Hommelwerke GmbH, ref. #240851, Schweningen, Germany*), que constitui um aparelho de alta sensibilidade, com ponta apalpadora esférica de diamante, utilizado para medir rugosidade superficial quantitativamente. Essa ponta percorre a superfície e é acoplada a uma unidade que processa e interage a informação. O resultado é registrado de imediato por meio de um *software (Turbo Datawin-NT Version 1.34, Copyright® 2001)*. As mensurações foram feitas aleatoriamente sobre a superfície de cada quadrante dos corpos de prova, totalizando 3 leituras para cada espécime. O valor de rugosidade superficial de cada corpo de prova foi determinado pela média aritmética das leituras de cada um dos 4 quadrantes (DA SILVA *et al.*, 2011).

A rugosidade média [Ra (μm)] foi o padrão escolhido para propiciar condições de comparação com resultados de outros estudos realizados onde essa escala foi empregada, traduzindo o valor da média aritmética de todas as distâncias absolutas do perfil de rugosidade, dentro da extensão de medida Lm [Limite de medição (extensão considerada na leitura)]. O parâmetro Ra foi de $4\mu\text{m}$, similar à rugosidade presente na superfície interna das próteses totais, capaz de facilitar a posterior adesão fúngica à superfície do acrílico. Aqueles corpos de prova que não estiveram dentro desta medida foram descartados. Em seguida, os corpos de prova foram submetidos à limpeza em ultrassom (Arotec Odontobrás) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis debris na superfície da resina (DA SILVA *et al.*, 2011; VALENTINI *et al.*, 2013). Posteriormente, foram deixados ao ar livre por 48h para secagem e liberação de monômeros residuais e então enviados para esterilização por meio de óxido de etileno (Acecil® – Central de esterilização comércio e indústria Ltda, Campinas, Brazil) (NEPPELENBROEK *et al.*, 2005).

4.4 MANIPULAÇÃO DE *C. ALBICANS* SC5314: OBTENÇÃO DA PRÉ-CULTURA E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Em todos os experimentos foi utilizada a cepa do fungo *Candida albicans* selvagem SC5314, cedida pelo Dr. Arnaldo Lopes Colombo, diretor técnico do Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo e manipulada nas dependências do Centro Integrado de Pesquisa (CIP) da FOB/USP. O preparo do inóculo foi feito da seguinte maneira: as células mantidas a -80°C em

solução contendo 20% de glicerol em meio de cultura YEPD foram semeadas em placas contendo Ágar Sabouraud (por litro: 10g yeast extract, 10g peptone, 20g dextrose, 20g bacto Agar) incubadas a 30°C durante 24h em estufa.

Uma única colônia de *C. albicans* foi removida, ressuspensa em 50mL de meio de cultura YEPD e mantida na incubadora (Nova Ética) a 30°C, sob agitação 180rpm overnight (aproximadamente 16 horas). Foram retirados 1mL da cultura e colocados em tubos Falcon contendo 14mL de PBS para centrifugação a 5000rpm por 10 minutos a 22°C; em seguida, o sobrenadante foi descartado. A purificação das células foi feita através da lavagem do pellet com 14mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e homogeneização em vórtex seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, desprezando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

O pellet final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuspensa em 1mL de PBS e diluído a 1:1000. Uma alíquota da diluição (10µL) associada com colorante foi colocada em câmara de Neubauer para contagem de leveduras em microscópio óptico comum. Depois de obtida a concentração final da suspensão, esta foi diluída em PBS (*Phosphate Buffer Solution* - Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) para aquisição de inóculo em concentração de 1×10^6 células/mL (para análises de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração fungicida mínima (CFM) em células planctônicas) e 1×10^7 células/mL (para análises em biofilme) (EUCAST, 2000).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA FRENTE A CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE *C. ALBICANS*

A fim de determinar o potencial antimicrobiano das nanopartículas, realizamos inicialmente ensaios para a determinação da CIM e da CFM, sobre células fúngicas planctônicas. Para tal, o inóculo de *C. albicans* foi padronizado a uma concentração de 10^6 células/mL, como preconiza o protocolo EUCAST (EUCAST, 2000). Diluições seriadas em até 10 vezes da nistatina (controle positivo), na concentração 32 mg/mL, e das NpsAg e NpsZr, nas concentrações de 4mM/mL e 30mg/mL respectivamente, foram realizadas em placas de 96 poços contendo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute* - Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) -1640 + 2% de glicose (*Dulbecco's*

Modified Eagle Medium, Gibco®). Em cada poço, foram adicionados 100µL da suspensão de *C. albicans* e a placa foi incubada em estufa a 35°C por 24h.

Como controles, poços contendo apenas o meio de cultura “BLANK” e poços contendo o inóculo + RPMI-1660 (controle de crescimento) foram adicionados. Além disso, poços com nistatina + RPMI-1660 + o inóculo (controle de morte) foram incluídos. Portanto, a CIM foi calculada através da divisão da densidade ótica (DO) de cada concentração pela DO do controle de crescimento (apenas o inóculo + RPMI-1660) equivalente a 100% de crescimento fúngico e, estes percentuais foram subtraídos de 100. Os dados foram transferidos para percentual de morte.

Assim, foram obtidos os valores quantitativos comparativos com as concentrações de interesse analisadas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, na absorvância de 540nm, após 24h de ensaio. A menor concentração em mg.mL⁻¹ das nanopartículas que foi capaz de inibir 50% do crescimento de *C. albicans* foi considerada a CIM neste ensaio. A menor concentração capaz de causar morte fúngica, ou seja, a falta de crescimento microbiano (ausência de UFCs, resultada da morte de 99,9% do inóculo) na placa de Petri foi considerada a CFM neste ensaio (KURITA *et al.*, 1981; DE BONA *et al.*, 2014).

A partir das concentrações das quais os valores de DO no teste da CIM realizado anteriormente foram iguais ou menores do que 50%, retirou-se uma alíquota de 50µL e procedeu-se a inoculação dessas concentrações na superfície do Ágar Sabouraud Dextrose (Difco®, Detroit, Michigan, EUA), em duplicata, com o auxílio da alça de Drigalsky (DE BONA *et al.*, 2014). As placas foram incubadas a 37°C e, após 24h, as unidades formadoras de colônias foram quantificadas, definindo-se, assim, a CFM como a menor concentração capaz de causar morte fúngica (KURITA *et al.*, 1981). Para este ensaio, foram realizados três experimentos independentes.

4.6 TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DOS CORPOS DE PROVA DE RESINA ACRÍLICA TERMOPOLIMERIZÁVEL

O tratamento da superfície dos corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável seguiu a metodologia de Almeida *et al.* (2018) com algumas modificações. Utilizando-se a cabine de segurança microbiológica sob temperatura ambiente (Mod. FLV-808/3, Filterflux®, Piracicaba, SP, Brasil) e previamente desinfetada com álcool 70%, os corpos de prova foram removidos do envelope de

esterilização com o auxílio de uma pinça estéril (S.S. White® Art. Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, então, colocados, individualmente, no interior de poços em placa de cultura de 24 poços (TPP®91015 - *Techno Plastic Products, Trasadingen, SH, Switzerland*) (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Previamente ao tratamento, as nanopartículas ou a nistatina (controle positivo) foram incorporadas à solução do verniz fotopolimerizável (Palaseal®, Odonto Mega, Ribeirão Preto, SP, Brasil) obedecendo a proporção 2:1, ou seja, 100µl de verniz para 50µl de antimicrobiano (nistatina, NpsAg ou NpsZr). Em seguida, a superfície dos espécimes de resina foi tratada aplicando-se uma camada de verniz incorporado ou não com NpsAg, NpsZr ou nistatina com o auxílio de um microbrush. Como controle negativo, 1mL apenas de PBS foi aplicado sobre a superfície dos espécimes de resina (ALMEIDA *et al.*, 2018). Por fim, os seguintes grupos experimentais (n=6/grupo) foram formados, de acordo com o tratamento:

- I. Grupo **PBS** (controle negativo): apenas PBS;
- II. Grupo **Ver**: somente verniz;
- III. Grupo **Ver+Nist** (controle positivo): verniz incorporado de nistatina a 32mg/PBS;
- IV. Grupo **Ver+Ag**: verniz incorporado de nanopartículas de prata a 4mM/PBS;
- V. Grupo **Ver+Zr**: verniz incorporado de nanopartículas de zircônia a 30mg/PBS.

Após aplicação do verniz incorporado ou não, os espécimes foram polimerizados por 90 segundos utilizando um fotopolimerizador com lâmpadas ultravioletas (UVA) (EDG Lux, EDG, São Carlos, SP, Brasil), após período de exposição de aproximadamente 20 segundos (ALMEIDA *et al.*, 2018).

4.7 DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE *C. ALBICANS* SOBRE A SUPERFÍCIE DE CORPOS DE PROVA

Após o tratamento ou não da superfície, foi pipetado 1mL do inóculo de *Candida albicans* (SC5314) na concentração de 1×10^7 células/mL sobre a superfície dos corpos de prova já posicionados em placas de cultura 24 poços (TPP® - *Techno Plastic Products, Trasadingen*). O tempo de adesão foi de 90 minutos a temperatura de 37°C, sob agitação de 75rpm em incubadora com agitação orbital (Shaker – Mod.

430/RDPB, Nova Ética®, Produtos e Equipamentos Científicos LTDA, Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) (CHANDRA *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2010).

Cessados os 90 minutos, as células que não aderiram sobre a superfície da resina acrílica foram removidas através de lavagem suave e individual, com auxílio de uma pinça estéril (S.S. White® Art. Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), em 1mL de PBS estéril. Na sequência, os corpos de prova foram submersos em 1mL de meio de cultura RPMI-1640 e incubados a 37°C sob agitação de 75rpm durante os períodos estipulados para indução do crescimento do biofilme (24hrs, 7 e 14 dias) (KUMAMOTO, 2002; KUCHARÍKOVÁ *et al.*, 2011; CHANDRA *et al.*, 2001; BIZERRA *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2010). O biofilme de *Candida albicans* desenvolvido sobre a superfície dos corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, previamente tratados ou não, foi avaliado através da(o): 1. contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro e; 2. ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME DE *C. ALBICANS* POR MEIO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR MILILITRO (UFC/ML)

Cessado os períodos de indução do biofilme, cada corpo de prova foi retirado do poço da placa de cultura de 24 poços contendo meio de cultura RPMI-1640 com o auxílio de uma pinça estéril (S.S. White® Art. Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, eles foram colocados, cuidadosa e individualmente, em outros poços da mesma placa contendo 1mL de PBS, de forma que o espécime ficasse totalmente submerso na solução por 1 minuto. Posteriormente, com o auxílio de um microbrush de tamanho regular (Microdont) e uma pinça estéril (S.S. White® Art. Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foi realizado o desprendimento, delicadamente, das células fúngicas (TOBUDIC *et al.*, 2010).

Após, a partir de 1mL desta suspensão fúngica formada, foram realizadas diluições seriadas em PBS, ou seja, 10^{-1} a 10^{-4} em uma nova placa de cultura 24 poços. A diluição ideal para a contabilização das unidades formadoras de colônia foi obtida através de estudos piloto. Então, alíquotas de 100µL da diluição selecionada foram plaqueadas em quadruplicata, em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (Difco®, Detroit, Michigan, EUA) com cloranfenicol, e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas (TOBUDIC *et al.*, 2010; ESTIVILL *et al.*, 2011). Foram realizados 3

experimentos independentes para cada período. Encerrado o período de incubação, as colônias viáveis do gênero *Candida spp.* foram visualmente quantificadas e os valores foram aplicados na seguinte fórmula:

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (3 ou 4), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição nas placas de Petri. Portanto, no presente estudo, $q = 0,100$ correspondente às alíquotas de 100 μ L para cada diluição. Os valores médios de cada grupo foram transformados em valores logarítmicos e devidamente catalogados para posterior avaliação estatística.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME FÚNGICO PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO DE REDUÇÃO DE SAIS DE TETRAZÓLIO – XTT

A susceptibilidade de *Candida albicans* aos diferentes tratamentos foi avaliada pelo percentual de redução da atividade metabólica do biofilme fúngico formado sobre os corpos de prova. Esta análise foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT (2,3 Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenil) -5-[(Phenyl-Amino) Carbonyl] – 2H- Tetrazolium Hidroxide – Sigma Aldrich® Inc., St Louis, MO, EUA) (KUHN *et al.*, 2002; RAMAGE *et al.*, 2001; REDDING *et al.*, 2009). Os sais de tetrazólio, de cor amarela, penetram rapidamente nas células intactas, ou seja, viáveis, sendo convertidos, por ação enzimática, em produtos de cor laranja. Estes produtos são solúveis em água, permitindo sua quantificação em espectrofotometria em sobrenadantes celulares (KUHN *et al.*, 2002).

Para a utilização do XTT, uma solução do sal foi preparada previamente de acordo com a metodologia de Da Silva *et al.* (2008) na concentração de 1mg/mL com água Milli-Q (Millipore Indústria e Comércio Ltda, Barueri, SP, Brasil), sendo esterilizada em seguida por filtração a vácuo (PES 70mm Diameter Membran, 0,22 μ m, pore size, TPP®, *Techno Plastic Products*, Trasadingen, Switzerland). Então, a solução de XTT foi misturada com uma solução de menadiona (0,5 mg/ml⁻¹, Sigma Aldrich® Inc., St Louis, MO, EUA) preparada com acetona na concentração de 1mM e com PBS contendo 200 mM de glicose (DA SILVA *et al.*, 2008b).

Cessado cada período de indução do biofilme (24 horas, 7 e 14 dias), os corpos de prova foram removidos, com o auxílio de uma pinça estéril (S.S. White® Art. Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), dos poços da placa de 24 poços contendo meio de cultura RPMI-1640, na qual o biofilme foi induzido. Em seguida, foram imersos, cuidadosamente, três vezes, em novos poços da mesma placa contendo 1,5mL de PBS, para retirada das células planctônicas.

A partir deste momento, foram transferidos e submersos, individualmente, para novos poços da mesma placa de 24 poços contendo 2mL da solução de XTT. Na sequência, a placa de cultura com a solução de XTT foi coberta com uma folha de papel alumínio e então colocada em incubadora sem agitação orbital (Shaker – Mod. 430/RDPB, Nova Ética®, Produtos e Equipamentos Científicos LTDA, Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) por 2 horas a 37°C para permitir a reação da solução de XTT sobre as células fúngicas.

Após esse período, a alíquota de 2mL da solução de cada poço foi transferida, individualmente, para microtubos (Safe-lock – 2,0mL, Eppendorf® do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e, em seguida, estes foram submetidos à centrifugação a 10°C por 2 minutos, sob velocidade de 10.000rpm para promover a decantação de possíveis células fúngicas presentes no sobrenadante (CHANDRA *et al.*, 2001; KUHN *et al.*, 2003). Do sobrenadante da solução centrifugada de cada microtubo, 200uL foram transferidos, em quintuplicata (totalizando 1mL por grupo), para uma placa de cultura de 96 poços (TPP® - *Techno Plastic Products, Trasadingen Switzerland*), a qual foi submetida a leitura da absorbância em espectrofotômetro (*Sinergy MX Monochromator Based Biotek® Winoosky, Vermont, USA*) em comprimento de onda de 550nm para a avaliação da atividade metabólica das células viáveis do biofilme de *Candida albicans*. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período de avaliação.

O valor encontrado para leitura da solução de XTT é denominado “BLANK”, que define, por sua vez, uma absorbância mínima a ser descontada das demais leituras. Os valores coletados de todos os grupos experimentais foram descontados do BLANK, sob o mesmo comprimento de onda. As porcentagens de redução da atividade metabólica das células viáveis do biofilme de *Candida albicans* foram calculadas a partir das DO obtidas nos poços contendo os corpos de prova sem tratamento (grupo PBS, o qual representa 100% de atividade metabólica/viabilidade) e estes percentuais foram subtraídos de 100, alcançando o percentual de morte.

4.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos foram expressos por meio da média \pm desvio padrão e analisados de acordo com o padrão de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Considerando a homogeneidade de variâncias, foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) a um critério (*One-Way*, para a análise da CIM e da CFM) e a dois critérios (*Two-Way*) de medidas repetidas (para a análise dos grupos e períodos), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*), possibilitando, assim, a comparação entre os tempos e os grupos. Para esta análise estatística, o *software* Prism GraphPad na versão 5.00.288 (*Graphad*[®], Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA DAS NANOPARTÍCULAS E DA NISTATINA FRENTE A CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE *CANDIDA ALBICANS*

Após 24 horas de incubação para o crescimento das células planctônicas, todas as concentrações de nistatina acima de 0,12% resultaram em um percentual de morte superior a 50%, enquanto a concentração mínima capaz de inibir o crescimento fúngico foi 0,5mg/mL. Para as NpsAg, a concentração 0,25mM/mL foi a responsável pela inibição de, pelo menos, 50% do crescimento microbiano e pela ausência de colônias na placa de Petri. A CIM para as NpsZr foi 15mg/mL, enquanto a CFM não foi determinada nas concentrações testadas.

As Figuras 1, 2 e 3 demonstram esses valores percentuais de morte de *C. albicans* (A), assim como da quantificação de UFC/mL (B) dos fungos na forma planctônica, após desafio *in vitro* com diluições seriadas de nistatina, NpsAg e NpsZr, respectivamente.

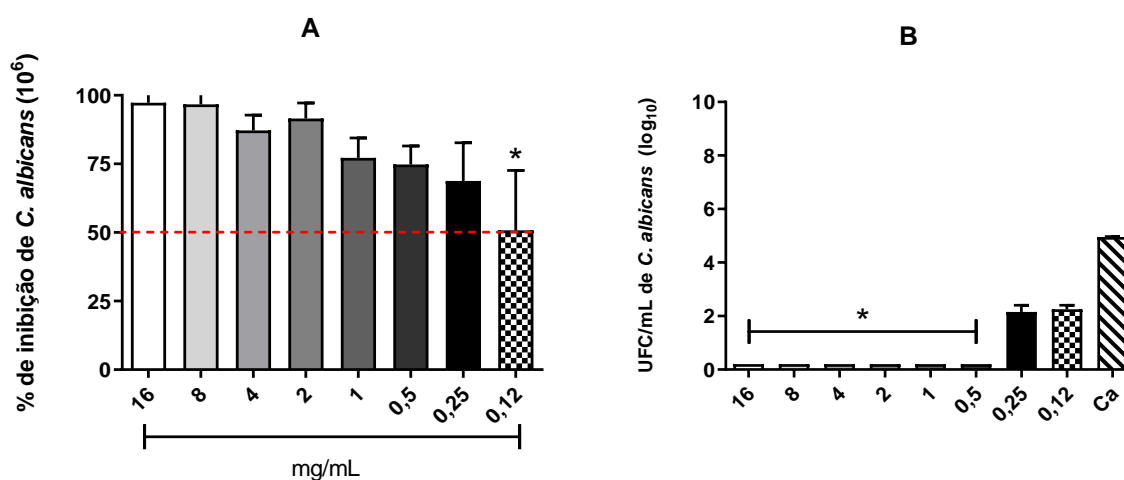


Figura 1 - (A) Concentração inibitória mínima e (B) Concentração fungicida mínima de nistatina contra células planctônicas de *Candida albicans*. De acordo com o protocolo EUCAST, ambos os ensaios foram realizados com 10⁶ células/mL de *C. albicans* (SC5314) desafiadas com diluições seriadas de 16 a 0,12 mg/mL de nistatina. Em (A), a linha tracejada vermelha representa 50% de inibição do crescimento de *C. albicans* e os dados foram transportados para porcentagem de morte fúngica, de acordo com os valores obtidos no controle de crescimento (inóculo + RPMI-1660). Em (B), Ca representa o valor médio do grupo controle de crescimento apenas com o inóculo de *C. albicans* e os resultados foram transformados logaritmicamente (log₁₀). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata e ambos os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) um critério (*One-Way*), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * representa $p < 0,05$ em relação às demais concentrações (A) ou em relação ao grupo Ca (B).

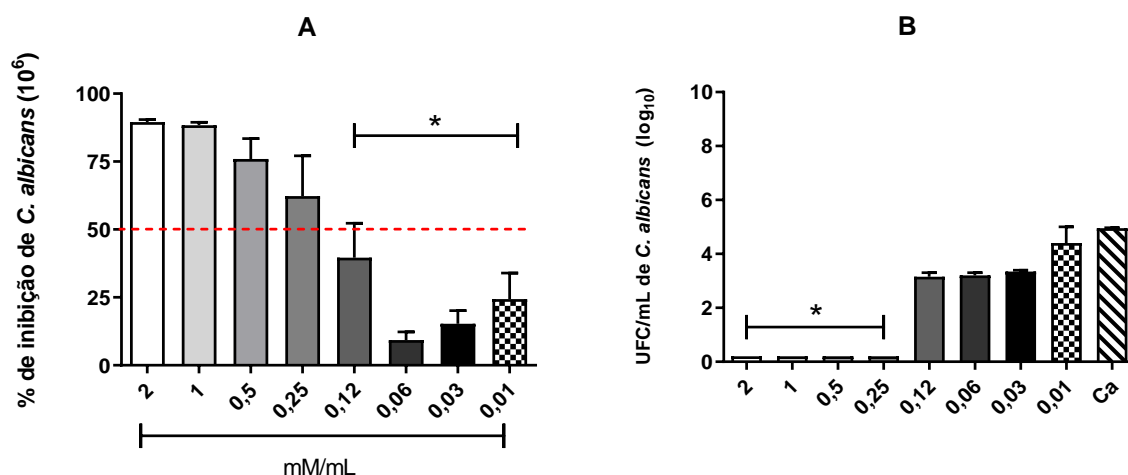


Figura 2 - (A) Concentração inibitória mínima e (B) Concentração fungicida mínima de nanopartículas de prata (NpsAg) contra células planctônicas de *Candida albicans*. De acordo com o protocolo EUCAST, ambos os ensaios foram realizados com 10⁶ células/mL de *C. albicans* (SC5314) desafiadas com diluições seriadas de 2 a 0,01 mM/mL de NpsAg. Em (A), a linha tracejada vermelha representa 50% de inibição do crescimento de *C. albicans* e os dados foram transportados para porcentagem de morte fúngica, de acordo com os valores obtidos no controle de crescimento (inóculo + RPMI-1660). Em (B), Ca representa o valor médio do grupo controle de crescimento apenas com o inóculo de *C. albicans* e os resultados foram transformados logaritmicamente (log₁₀). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata e ambos os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) um critério (*One-Way*), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * representa p<0,05 em relação às demais concentrações.

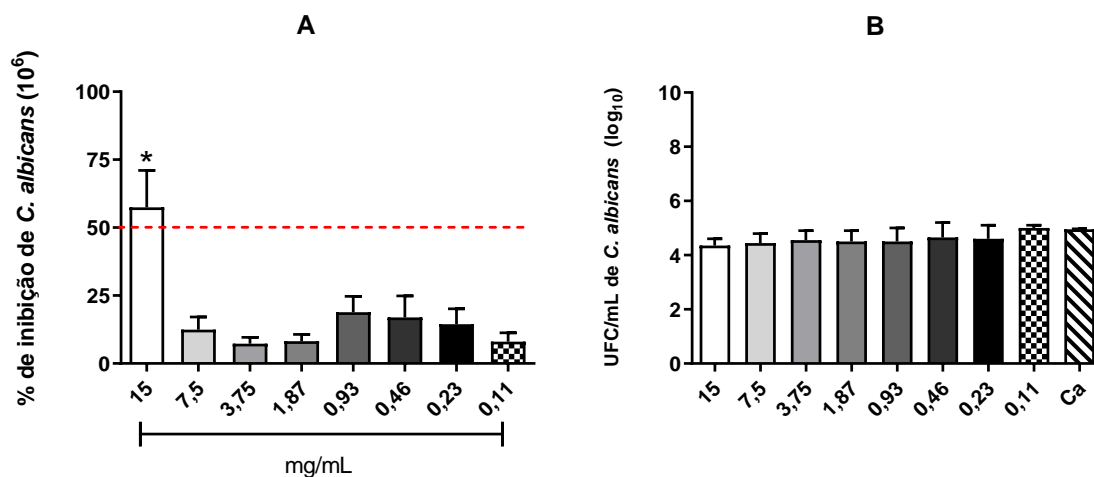


Figura 3 - (A) Concentração inibitória mínima e (B) Concentração fungicida mínima de nanopartículas de zircônia (NpsZr) contra células planctônicas de *Candida albicans*. De acordo com o protocolo EUCAST, ambos os ensaios foram realizados com 10⁶ células/mL de *C. albicans* (SC5314) desafiadas com diluições seriadas de 15 a 0,11 mg/mL de NpsZr. Em (A), a linha tracejada vermelha representa 50% de inibição do crescimento de *C. albicans* e os dados foram transportados para porcentagem de morte fúngica, de acordo com os valores obtidos no controle de crescimento (inóculo + RPMI-1660). Em (B), Ca representa o valor médio do grupo controle de crescimento apenas com o inóculo de *C. albicans* e os resultados foram transformados logaritmicamente (log₁₀). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata e ambos os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) um critério (*One-Way*), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * representa p<0,05 em relação às demais concentrações.

Em suma, esses resultados revelam que ambas as nanopartículas apresentam potencial antimicrobiano contra células planctônicas de *C. albicans*. Desse modo, considerando que o objetivo principal deste trabalho foi quantificar o biofilme de *C. albicans* induzido *in vitro* e avaliar seu percentual de redução sobre a superfície de corpos de prova, tendo sido eles previamente tratados ou não, nós optamos em utilizar as maiores concentrações das nanopartículas assim como a da nistatina, visto que o biofilme é mais resistente à ação dos compostos antimicrobianos do que às células planctônicas.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME FÚNGICO FORMADO SOBRE A SUPERFÍCIE DA RESINA ACRÍLICA TERMOPOLIMERIZÁVEL, PREVIAMENTE TRATADA COM A ASSOCIAÇÃO VERNIZ/NPSAG OU NPSZR, POR MEIO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR MILILITRO (UFC/ML)

A Figura 4 ilustra os resultados descritos a seguir. Como esperado, o biofilme de *C. albicans* desenvolvido sobre a superfície dos corpos de prova não tratados (grupo PBS) apresentou os valores mais altos de UFC/mL em todos os períodos (24h, 7 e 14 dias). Em comparação com o grupo PBS, o tratamento com verniz interferiu no crescimento fúngico do biofilme induzido sobre a superfície da resina acrílica em todos os períodos avaliados, porém com diferença estatisticamente significativa apenas no período inicial de 24h.

O tratamento dos corpos de prova com verniz associado às nanopartículas também resultou em significativa redução das UFC/mL do biofilme de *C. albicans* aderido sobre sua superfície em comparação ao grupo controle negativo (PBS) em todos os períodos avaliados, similar ao observado após tratamento com verniz associado a nistatina. Destaca-se que, no período inicial de 24h, o potencial antimicrobiano do verniz incorporado com NpsAg (grupo Ver+Ag) ou NpsZr (grupo Ver+Zr) foi superior àquele observado após tratamento com verniz não associado a Nps (grupo Ver), considerando a contagem de UFC/mL do biofilme induzido. Desse modo, ambas as incorporações de nanopartículas (prata e zircônia) amplificaram o potencial antifúngico do verniz nas primeiras 24h de indução do biofilme de *C. albicans*.

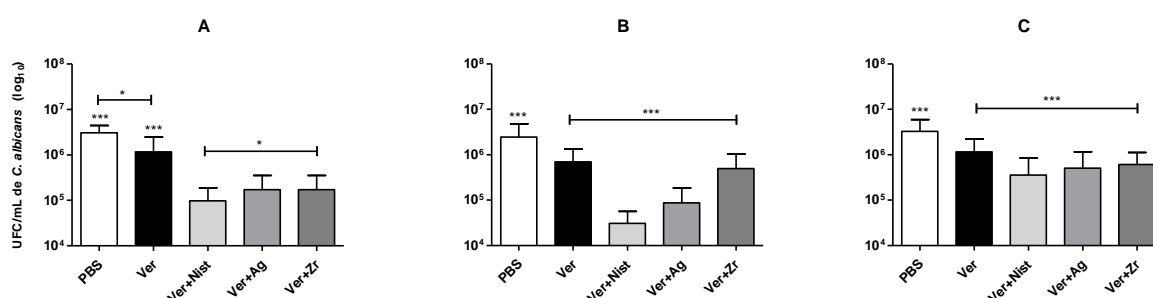


Figura 4 - Comparação dos grupos PBS, Ver, Ver+Nist, Ver+Ag e Ver+Zr, com relação às unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) do biofilme de *C. albicans* induzido por 24h (A), 7 (B) e 14 (C) dias sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável. As abreviações Ver e Ver+Nist, representam, respectivamente, os corpos de prova tratados apenas com o verniz e com a associação da nistatina ao verniz. A sigla PBS representa os corpos de prova não tratados. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período em quadruplicata. Resultados obtidos através da Análise de Variância (ANOVA) dois critérios (*Two-Way*), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. Símbolos iguais representam $p < 0,05$ para cada período individualmente.

Como esperado, o grupo controle Ver+Nist apresentou os menores valores de UFC/mL (crescimento fúngico) em todos os períodos avaliados, porém não diferindo, estatisticamente, dos grupos tratados com a incorporação de Nps. Os valores de UFC/mL obtidos após os tratamentos com os nanomateriais foram similares com o passar do tempo, quando analisados individualmente.

5.3 REDUÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME FÚNGICO FORMADO SOBRE A SUPERFÍCIE DA RESINA ACRÍLICA TERMOPOLIMERIZÁVEL PREVIAMENTE TRATADA COM A ASSOCIAÇÃO VERNIZ/NPSAG OU NPSZR, POR MEIO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DE REDUÇÃO DE SAIS DE TETRAZÓLIO – XTT

Por meio do ensaio XTT (Figura 5), verificou-se que o tratamento dos corpos de prova com nanopartículas de prata incorporadas ao verniz (grupo Ver+Ag), nos períodos de 24h e 14 dias, resultou em maior percentual de redução da atividade metabólica do biofilme fúngico quando comparado com o tratamento apenas com verniz. Diferentemente, a incorporação de NpsZr levou ao maior percentual de redução da atividade metabólica do biofilme aos 7 e 14 dias em comparação ao tratamento apenas com verniz. Como esperado, a incorporação da nistatina ao verniz reduziu, expressivamente, o metabolismo de *C. albicans* aderida sobre a resina

acrílica em todos os períodos avaliados, quando comparada ao tratamento com verniz (grupo Ver).

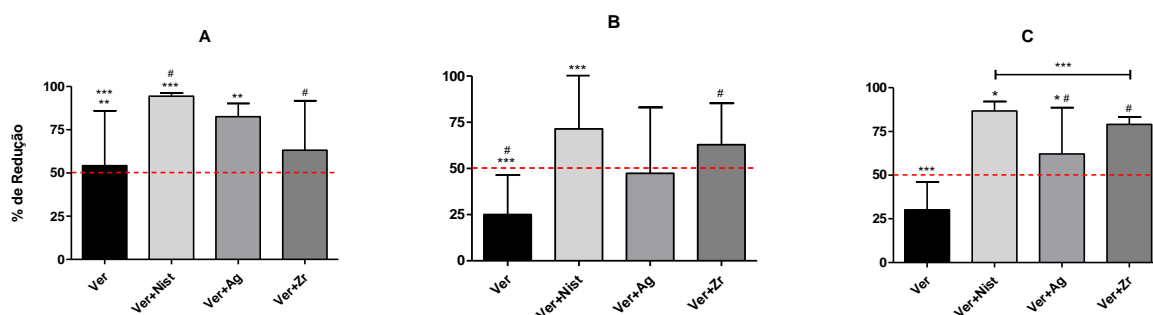


Figura 5 - Comparação dos grupos PBS, Ver, Ver+Nist, Ver+Ag e Ver+Zr, com relação ao percentual (%) de redução da atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* induzido por 24h (A), 7 (B) e 14 (C) dias sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, por meio do ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio – XTT. As abreviações Ver e Ver+Nist representam, respectivamente, os corpos de prova tratados apenas com o verniz e com a associação da nistatina ao verniz. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período em quintuplicata. O tracejado vermelho indica 50% de redução do biofilme formado. Resultados obtidos através da Análise de Variância (ANOVA) dois critérios (*Two-Way*), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. Símbolos iguais representam $p < 0,05$ para cada período individualmente.

Comparando-se os diferentes tratamentos, para cada período individualmente, observou-se que não houve diferença entre os grupos Ver+Ag e Ver+Zr nos períodos de 24h e 7 dias, quanto ao percentual de redução metabólica fúngica. Porém, aos 14 dias, o tratamento com Ver+Zr resultou em maior percentual de redução da atividade metabólica fúngica do que Ver+Ag.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Acreditando nas vantagens em se propor métodos complementares para o tratamento da estomatite protética, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a incorporação de diferentes nanopartículas ao verniz fotopolimerizável, de uso odontológico, aumentaria seu potencial antifúngico frente ao biofilme de *C. albicans* sobre a superfície de espécimes de resina acrílica termopolimerizável, utilizada como base das próteses totais removíveis.

O uso de nanomateriais na área odontológica tem se tornado cada vez mais popular devido aos seus efeitos antimicrobianos e à sua biocompatibilidade tecidual (FERNANDEZ *et al.*, 2021). De fato, nanopartículas de prata e zircônia, utilizadas no presente trabalho, apresentam potencial antimicrobiano contra células planctônicas e contra biofilme de *C. albicans*, como detectado por meio do ensaio de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima.

Vernizes fotopolimerizáveis a base de metacrilatos, como o Palaseal®, têm sido frequentemente utilizados em Odontologia pela sua capacidade de preencher irregularidades de superfícies ásperas da resina acrílica de próteses totais removíveis, fornecendo uma camada fina e brilhante que não interfere no assentamento da prótese e, ainda, reduz a aderência de fungos e conseqüentemente diminui ou impede o desenvolvimento da EP (YOSHIJIMA *et al.*, 2010; YAMAUCHI *et al.*, 1990). Formas filamentosas de *Candida spp.* possuem a capacidade de se alojar profundamente no interior de deformidades na superfície destas próteses (RAMAGE *et al.*, 2004). Desse modo, a presença de rugosidade superficial é um dos principais fatores locais colaboradores para a instalação da EP (MORGAN; WILSON, 2001; VON FRAUNHOFER; LOEWY, 2009).

Para a viabilização deste estudo, a superfície de corpos de prova de resina acrílica foi inicialmente tratada por meio da aplicação do verniz Palaseal® incorporado ou não com os diferentes tipos de nanopartículas - prata ou zircônia. Posteriormente, tais superfícies foram submetidas ao desenvolvimento *in vitro* de biofilmes de *C. albicans*. Para avaliar o efeito do tratamento, duas metodologias foram utilizadas: a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro e o ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio, que se baseia na verificação da atividade mitocondrial. Ambos os ensaios representam métodos muito utilizados para a avaliação da ação antimicrobiana de fármacos (SENEVIRATNE *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013;

GOLDMAN; GREEN, 2015). Por meio do ensaio UFC, é possível estimar o número de células microbianas com base na sua capacidade de formar colônias sob condições específicas em determinado meio de cultura. Adota-se que cada colônia contabilizada foi originada por uma única célula fúngica viável (GOLDMAN; GREEN, 2015). Uma vez que neste trabalho foi necessária a raspagem mecânica do biofilme aderido sobre a superfície dos espécimes de resina acrílica, é importante considerar a possibilidade de dano nas estruturas celulares, sendo possível, portanto, a obtenção de resultados distintos em um mesmo grupo. Por meio do ensaio XTT, é possível detectar, através da atividade das desidrogenases mitocondriais, as leveduras e hifas metabolicamente ativas no biofilme (SENEVIRATNE *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013).

Neste trabalho, após diferentes períodos de desenvolvimento do biofilme, o tratamento da superfície da resina acrílica apenas com o verniz Palaseal[®], sem incorporação de nanopartículas, resultou em redução do crescimento do biofilme de *C. albicans* quando comparado com os espécimes não tratados (grupo PBS), bem como na redução da atividade metabólica das células fúngicas, com média percentual de 25 a 50%. A interferência sobre o desenvolvimento do biofilme foi maior nas primeiras 24h.

Em sua composição, o Palaseal[®] não possui agentes antimicrobianos. No entanto, já que é composto principalmente por metacrilatos, este verniz proporciona uma superfície mais homogênea e lisa, interferindo na hidrofobia da superfície da resina à base de PMMA, ou seja, promovendo uma maior molhabilidade e um aumento da hidrofília superficial. Por esse motivo, é um material que proporciona uma barreira física contra a adesão fúngica (em especial de *C. albicans*), resultando em um efeito antimicrobiano enquanto se mantiver íntegro sobre a resina acrílica (KOROGLU *et al.*, 2016; SAHIN *et al.*, 2016).

De forma inovadora, o presente trabalho revelou que a incorporação de nanopartículas ao verniz Palaseal[®] amplificou o efeito antibiofilme fúngico deste material odontológico. Na comparação com o tratamento apenas com o verniz, o tratamento, baseado na incorporação das NpsAg e NpsZr na composição do material, resultou na redução de UFC/mL de *C. albicans* sobre a superfície da resina acrílica principalmente nas primeiras 24h. Já a redução da atividade metabólica do biofilme foi evidenciada, de forma significativa, após a incorporação das NpsAg, nos períodos de 24h e 14 dias e, após incorporação das NpsZr, nos períodos de 7 e 14 dias, em comparação com os espécimes tratados com verniz apenas.

De um modo geral, chama a atenção, portanto, que o efeito antimicrobiano do verniz incorporado de Nps foi mais expressivo nas primeiras 24h de formação do biofilme fúngico, principalmente das NpsAg. Isso pode estar relacionado, em parte, com o tempo de vida útil do material de revestimento utilizado. Neste trabalho, infelizmente não foi possível mensurar com exatidão o tempo de permanência do verniz sobre a superfície dos corpos de prova de resina acrílica.

Sendo assim, considerando os tratamentos com nanopartículas avaliados, nós consideramos que os resultados apresentados após tratamento com verniz incorporado com NpsAg foram melhores quando comparados com o tratamento com as NpsZr, já que a maior redução da atividade metabólica em paralelo com a redução de UFC/mL do biofilme de *Candida albicans* sobre a superfície da resina acrílica, em um período inicial (24h), foi observada no grupo Ver+Ag versus Ver. Um efeito antimicrobiano nos períodos iniciais da formação do biofilme pode ser mais importante no combate a EP do que um efeito tardio por atuar na fase de adesão do biofilme, podendo proporcionar uma ação preventiva. Nesta fase, as células fúngicas isoladas, ainda na forma de leveduras, aderem ao substrato formando uma camada basal de células. A partir desta camada inicial, há a formação de hifas filamentosas e a consequente invasão na mucosa do hospedeiro (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016). Por outro lado, a ação antimicrobiana das NpsZr se dá pela deformação do fungo quando já na forma de hifa, o que corrobora o potencial significativo do tratamento Ver+Zr de reduzir a atividade metabólica do biofilme nos períodos mais tardios, ou seja, 7 e 14 dias, em comparação com os espécimes tratados com verniz apenas (JANGRA *et al.*, 2012; VEERAAPANDIAN; SAWANT; DOBLE, 2012; GAD *et al.*, 2022).

Além disso, Hamid *et al.* (2021) concluíram que a incorporação de NpsZr ao PMMA, embora tenha reduzido a adesão fúngica, resultou em aumento da rugosidade da superfície da resina (HAMID *et al.*, 2021). Considerando que a adesão inicial de microrganismos em superfícies depende das propriedades físicas e químicas desta superfície, a rugosidade superficial desempenha um papel importante nas fases iniciais de formação dos biofilmes microbianos, incluindo de *Candida albicans*, sobre superfícies abióticas (LIU; ZHAO, 2005; BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997). A rugosidade superficial de 0,2 μ m é adotada como o limiar para adesão de microrganismos, a partir da qual a agregação microbiana aumenta significativamente (TEUGHELIS *et al.*, 2006; BOLLEN *et al.*, 1996). Por outro lado, a partir de outros

estudos, a incorporação de NpsAg ao PMMA não alterou as propriedades mecânicas como a dureza e a rugosidade superficial da resina (DE CASTRO *et al.*, 2016; HAMEDIRAD *et al.*, 2014).

Quanto aos mecanismos antimicrobianos das nanopartículas, como já mencionado, a ação das NpsZr se dá pela capacidade de deformar o fungo quando ele está na forma de hifa (JANGRA *et al.*, 2012; VEERAAPANDIAN; SAWANT; DOBLE, 2012; GAD *et al.*, 2022). As NpsAg, por sua vez, apresentam a capacidade de inibição da replicação do material genético e da síntese de proteínas, alterando o pareamento de bases do DNA, causando falha no processo de respiração das células fúngicas (HASHIM *et al.*, 2020; AHAMAD *et al.*, 2022; PRIYADARSINI; MUKHERJEE; MISHRA, 2018).

A incorporação das nanopartículas ao verniz protético apresentou, em geral, um menor efeito antimicrobiano quando comparado com o antifúngico padrão-ouro no tratamento da EP. Como esperado, a nistatina apresentou os menores valores de UFC/mL e os maiores percentuais de redução da atividade metabólica das células fúngicas em todos os períodos de indução do biofilme, em comparação com os demais grupos experimentais. Ainda assim, nossos resultados permitem afirmar que a incorporação de NpsAg e de NpsZr ao verniz Palaseal® melhorou o poder de interferência deste material no processo de adesão e desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* sobre a resina acrílica.

Do ponto de vista clínico, considerando a necessidade do uso prolongado e dos efeitos colaterais associados ao uso da nistatina e, ainda, mediante a possibilidade de seleção de cepas resistentes a esse antifúngico, é promissor estudar alternativas que sejam capazes de tratar a EP sem apresentar tais efeitos indesejados. No entanto, é importante salientar que este estudo apresenta limitações, dentre as quais incluem o fato de se tratar de um modelo *in vitro*, o fato de que as superfícies analisadas eram planas, enquanto a superfície de PTR, em realidade, apresenta curvas e ondulações e, ainda, devido à composição limitada do biofilme estudado. O biofilme presente na cavidade oral é mais complexo, pois inclui a presença de outros microrganismos e de outras condições não controladas como pH e temperatura, que podem impactar na sua virulência e comportamento biológico.

Portanto, embora resultados promissores tenham sido obtidos, uma comprovada eficácia clínica do uso de vernizes fotopolimerizáveis incorporados com nanopartículas exigirá a execução de ensaios adicionais, como aqueles *in vivo* e

posteriormente clínicos, além de estudos que explorem a manutenção das propriedades inerentes do verniz após incorporação de nanopartículas.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando o modelo experimental *in vitro* e com base nas metodologias utilizadas e nos resultados obtidos, foi possível concluir que a incorporação de nanopartículas de prata e de zircônia potencializaram o efeito antimicrobiano do verniz contra o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável.

Desse modo, sugerimos que a incorporação de nanopartículas de zircônia e, principalmente, de prata ao verniz fotopolimerizável Palaseal® apresenta efeitos promissores e inovadores para uso temporário na prevenção e tratamento da EP quando em associação com a correta higienização dos dispositivos protéticos.

Referências

REFERÊNCIAS

- Acosta, L. D.; Pérez-Camacho, O.; Acosta, R.; *et al.* Reduction of *Candida albicans* biofilm formation by coating polymethyl methacrylate denture bases with a photopolymerized film. **J Prosthet Dent**, v. 124, n. 5, p. 605-613, nov. 2020.
- Adam, Z. A.; Khan, S. B. Antimicrobial efficacy of silver nanoparticles Against *Candida albicans*: a systematic review protocol. **PLoS One**, v. 25, n. 16(1), p. e0245811, jan. 2021.
- Agarwal, A. K.; Rogers, P. D.; Baerson, S. R.; *et al.* Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 278, n. 37, p. 34998–35015, sep. 2003.
- Ahamad, I.; Bano, F.; Anwer, R.; *et al.* Antibiofilm Activities of Biogenic Silver Nanoparticles Against *Candida albicans*. **Front Microbiol**, v. 7, n. 12, p. 741493, jan. 2022.
- Akins R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 43, n. 4, p. 285-318, jun. 2005.
- Alabdulmohsen, Z. A.; Saad, A. Y. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. **Saudi Endod J**, v. 7, n. 1, p. 29-35. 2017.
- Alavarce, R. A. S.; Saldanha, L. L.; Almeida, N. L. M.; *et al.* The beneficial effect of *Equisetum giganteum* L. against *Candida* biofilm formation: New approaches to denture stomatitis. **Evid Based Complement Alternat Med**, 939625, jul. 2015.
- Al-Bakri, I. A.; Harty, D.; Al-Omari, W. M.; *et al.* Surface characteristics and microbial adherence ability of modified polymethylmethacrylate by fluoridated glass fillers. **Aust Dent J**, v. 59, n. 4, p. 482-489, dez. 2014.
- Al-Dwairi, Z. N.; Al-Quran, F. A.; Al-Omari, O. Y. The effect of antifungal agents on surface properties of poly(methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. **J Prosthodont Res**, v. 56, n. 4, p. 272-280, out. 2012.
- Alexander, B. D.; Johnson, M. D.; Pfeiffer, C. D.; *et al.* Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clin Infect Dis**, v. 56, n. 12, p.1724-1732, mar. 2013.
- Al-Fattani, M. A.; Douglas, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol**, v. 55, n. pt 8, p. 999-1008, ago. 2006.
- Al-Fouzan, A. F.; Al-Mejrad, L. A.; Albarrag, A. M. Adherence of *Candida* to complete denture surfaces in vitro: A comparison of conventional and CAD/CAM complete dentures. **J Adv Prosthodont**, v. 9, n. 5, p. 402-408, out. 2017.

- Ali, A. A.; Alharbi, F. A.; Suresh, C. S. Effectiveness of coating acrylic resin dentures on preventing *Candida* adhesion. **J Prosthodont**, v. 22, n. 6, p. 445-450, ago. 2013.
- Almeida, N. L. M.; Saldanha, L. L.; da Silva, R. A.; *et al.* Antimicrobial activity of denture adhesive associated with *Equisetum giganteum*- and *Punica granatum*-enriched fractions against *Candida albicans* biofilms on acrylic resin surfaces. **Biofouling**, v. 34, n. 1, p. 62-73, jan. 2018.
- Al-Rifaiy, M. Q. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of denture base acrylic resins. **Saudi Dent J**, v. 22, n.1, p. 13-7, dec. 2010.
- Al-Thobity, A. M.; Gad, M.; ArRejaie, A.; *et al.* Impact of denture cleansing solution immersion on some properties of different denture base materials: An in vitro study. **J Prosthodont**, v. 28, n. 8, p.913-919, out. 2019.
- Anusavice, K. J.; Shen, C.; Rawls, R. Phillips' science of dental materials. 12th ed. Philadelphia: **Saunders/Elsevier**, 2012. p. 94-483.
- Arendorf, T. M.; Walker, D. M. Denture stomatitis: a review. **J Oral Rehabil**, v. 14, n. 3, p. 217-227, mai. 1987.
- Armstrong-James, D.; Brown, G. D.; Netea, M. G.; *et al.* Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 12, p. e393-e402, dez. 2017.
- Awad, A. K.; Jassim, R. K. The effect of plasma on transverse strength, surface roughness and *Candida* adhesion of two types of acrylic denture base materials (Heat cure and light cure). **J Bagh Coll Dentistry**, v. 24, n. 2, p. 10-7, set. 2012.
- Bachtiar, E. W.; Bachtiar, B. M.; Jarosz, L. M.; *et al.* Al-2 of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, p. 94, jul. 2014.
- Bakhshi, M.; Taheri, J-B.; Shabestari, S. B.; *et al.* Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, p. e680-e684, jun. 2012.
- Barnabé, W.; de Mendonça, N. T.; Pimenta, F. C.; *et al.* 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**, v. 31, n. 5, p. 453-459, mai. 2004.
- Barros, J.; Silva, M. G.; Rodrigues, M. A.; *et al.* Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. **Int Endod J**, v. 47, n. 8, p. 725-734, ago. 2014.
- Behbahani, A.; Rowshanzamira, S.; Esmailifar, A. Hydrothermal Synthesis of Zirconia Nanoparticles from Commercial Zirconia. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 992-1003. 2012.

- Bergamo, V. Z.; Lana, D. F. D.; Pippi, B.; *et al.* New trends to combat *Candida* biofilm in dental prosthetics. **Clin Biomed Res**, v. 2, n. 38, p. 155-166. 2018.
- Bertrand, M. F.; Leforestier, E.; Muller, M.; *et al.* Effect of surface penetrating sealant on surface texture and microhardness of composite resins. **J Biomed Mater Res**, v. 53, n. 6, p. 658-663. 2000.
- Bizerra, F. C.; Nakamura, C. V.; de Poersch, C.; *et al.* Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res**, v. 8, n. 3, p. 442-450, mai. 2008.
- Blankenship, J. R.; Mitchell, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 588-594, dez. 2006.
- Blommaerts, N.; Vanrompay, H.; Nuti, S.; *et al.* Unraveling structural information of Turkevich synthesized plasmonic gold-silver bimetallic nanoparticles. **Small**, v. 15, n. 42, p. e1902791, ago. 2019.
- Bollen, C. M.; Lambrechts, P.; Quirynen, M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. **Dent Mater**, v. 13, n. 4, p. 258-269, jul. 1997.
- Bollen, C. M.; Papaioanno, W.; Eldere J. V.; *et al.* The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. **Clin Oral Implants Res**, v. 7, n. 3, p. 201-211, set. 1996.
- Bor, B.; Cen, L.; Agnello, M.; *et al.* Morphological and physiological changes induced by contact-dependent interaction between *Candida albicans* and *Fusobacterium nucleatum*. **Sci Rep**, v. 14, n. 6, p. 27956, jun. 2016.
- Budtz-Jorgensen E: The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand J Dent Res**, v. 82, n. 2, p. 151-190. 1974.
- Burgers, R.; Schneider-Brachert, W.; Rosentritt, M.; *et al.* *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. **Clin Oral Investig**, v. 13, n. 3, p. 293-299, set. 2009.
- Cağavi, F.; Akalan, N.; Celik, H.; *et al.* Effect of hydrophilic coating on microorganism colonization in silicone tubing. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 146, n. 6, p. 603-610, jun. 2004.
- Cao, W.; Zhang, Y.; Li, Q.; *et al.* Novel resin-based dental material with anti-biofilm activity and improved mechanical property by incorporating hydrophilic cationic copolymer functionalized nanodiamond. **J Mater Sci Mater Med**, v. 29, n. 11, p. 162, out. 2018.
- Cao, W.; Zhang, Y.; Wang, X.; *et al.* Development of a novel resin-based dental material with dual biocidal modes and sustained release of Ag⁺ ions based on photocurable core-shell AgBr/cationic polymer nanocomposites. **J Mater Sci Mater Med**, v. 28, n. 7, p.103, jul. 2017.

- Chandra, J.; Kuhn, D. M.; Mukherjee, P. K.; *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, set. 2001.
- Coco, B. J.; Bagg, J.; Cross, L. J.; *et al.* Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, n. 5, p. 377-383, out. 2008.
- Costa, A. C. C. P.; Pereira, C. A.; Freire, F.; *et al.* Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. **Mycoses**, v. 56, n. 6, p. 614-622, nov. 2013.
- Costa, M. S.; da Silva, C. H. L.; Oliveira, V. C.; *et al.* Effects of different forms of denture adhesives on biofilm formation, adhesive strength and hygiene of complete dentures. **Int J Prosthodont**, set. 2022.
- Da Silva, F. C.; Kimpara, E. T.; Mancini, M. N. G.; *et al.* Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. **J Prosthodont**, v. 17, n. 8, p. 627-633, dez. 2008a.
- Da Silva, P. M.; Acosta, E. J.; Pinto, L. de R.; *et al.* Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e712-e717, nov. 2011.
- Da Silva, W. J.; Seneviratne, J.; Parahitiyawa, N.; *et al.* Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. **Braz Dent J**, v. 19, n. 4, p. 364-369. 2008b.
- Da Silva, W. J.; Seneviratne, J.; Samaranayake, L. P.; *et al.* Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 94, n. 1, p. 149-156, jul. 2010.
- Davies, A.; Gebremedhin, S.; Yee, M.; *et al.* Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. **J Physiol Pharmacol**, v. 67, n. 5, p. 777-783, out. 2016.
- Dawson, C. C.; Intapa, C.; Jabra-Rizk, M. A. "Persisters": survival at the cellular level. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 7, p. e1002121, jul. 2011.
- De Bona, E. A. M.; Pinto, F. G. da S.; Fruet, T. L.; *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq Inst Biol**, v. 81, n. 3, p. 218-225, jul./set. 2014.
- De Castro, D. T.; Valente, M. L.; da Silva, C. H.; *et al.* Evaluation of antibiofilm and mechanical properties of new nanocomposites based on acrylic resins and silver vanadate nanoparticles. **Arch Oral Biol**, v. 67, p. 46-53, jul. 2016.

- De Sousa, F. A. C. G.; Paradella, T. C.; Koga-Ito, C. Y.; *et al.* Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. **Braz Oral Res**, v. 23, n. 4, p. 381-385, out./dez. 2009.
- Dong, J.; Carpinone, P. L.; Pyrgiotakis, G.; *et al.* Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. **Kona**, v. 37, p. 224-232, jan. 2020.
- El-Azizi, M.; Farag, N.; Khardori, N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 3, p. 14-21, abr. 2015.
- Ellepola, A. N.; Samaranayake, L. P. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. **Oral Dis**, v. 7, n. 1, p. 11-17, jan. 2001.
- Emami, E.; de Grandmont, P.; Rompré, P. H.; *et al.* Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. **J Dent Res**, v. 87, n. 5, p. 440-444, mai. 2008.
- Emmanouil, J. K.; Kavouras, P.; Kehagias, T. The effect of photo-activated glazes on the microhardness of acrylic baseplate resins. **J Dent**, v. 30, n. 1, p. 7-10, jan. 2002.
- Estivill, D.; Arias, A.; Torres-Lana, A.; *et al.* Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials, **J Microbiol Methods**, v. 86, n. 2, p. 238-242, ago. 2011.
- European Commite for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobials agents by agar dilution. **Clin Microbial Infect**, v. 6, n. 9, p. 509-515, set. 2000.
- Falsetta, M. L.; Klein, M.I.; Colonne, P. M.; *et al.* Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infect Immun**, v. 82, n. 5, p. 1968-1981, mai. 2014.
- Fathima, J. B.; Pugazhendhi, A.; Venis, R. Synthesis and characterization of ZrO₂ nanoparticles-antimicrobial activity and their prospective role in dental care. **Microb Pathog**, v. 110, p. 245-251, set. 2017.
- Feigal, D. W.; Katz, M. H.; Greenspan, D.; *et al.* The prevalence of oral lesions in HIV-infected homosexual and bisexual men: three San Francisco epidemiological cohorts. **AIDS**, v. 5, n. 5, p. 519-525. 1991.
- Fernandes, G. L.; Delbem, A. C. B.; do Amaral, J. G.; *et al.* Nanosynthesis of silver-calcium glycerophosphate: promising association against oral pathogens. **Antibiotics (Basel)**, v. 7, n. 3, p. 52, jun. 2018.
- Fernandez, C. C.; Sokolonski, A. R.; Fonseca, M. S.; *et al.* Applications of silver nanoparticles in dentistry: advances and technological innovation. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 5, p. 2485, mar. 2021.

Forsberg, K.; Woodworth, K.; Walters, M.; *et al.* *Candida auris*: the recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. **Med Mycol**, v. 57, n. 4, p. e7, jun. 2019.

Gad, M. M.; Abualsaud, R. Behavior of PMMA denture base materials containing titanium dioxide nanoparticles: A literature review. *Int J Biomater.* v. 2019, p. 6190610, jan. 2019.

Gad, M. M.; Abualsaud, R.; Rahoma, A.; *et al.* Double-layered acrylic resin denture base with nanoparticle additions: An in vitro study. **J Prosthet Dent**, v. 127, n. 1, p. 174-183, jan. 2022.

Gad, M. M.; Abualsaud, R.; Rahoma, A.; *et al.* Effect of zirconium oxide nanoparticles addition on the optical and tensile properties of polymethyl methacrylate denture base material. **Int J Nanomed**, v. 13, p. 283-292, jan. 2018.

Gad, M. M.; Fouda, S. M. Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatittis treatment. *Dent Med Probl*, v. 57, n. 1, p. 95-102 jan./mar. 2020.

Gebremedhin, S.; Dorocka-Bobkowska, B.; Prylinski, M.; *et al.* Miconazole activity against *Candida* biofilms developed on acrylic discs. **J Physiol Pharmacol**, v. 65, n. 4, p. 593-600, ago. 2014.

Gendreau, L.; Loewy, Z. G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. **J Prosthodont**, v. 20, n. 4, p. 251-260, jun. 2011.

Ghafari, T.; Rad, F. H.; Ezzati, B. Does addition of silver nano-particles to denture base resin increase its thermal conductivity? **Beheshti Univ Dent J**, v. 32, n. 2, p. 77-82. 2014.

Ghannoum, M.; Roilides, E.; Katragkou, A.; *et al.* The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: In vitro and in vivo model systems. **Clin Infect Dis**, v. 61, n. 6, p. S618-S621, dez. 2015.

Gleiznys, A.; Zdanavičienė, E.; Žilinskas, J. *Candida albicans* importance to denture wearers. a literature review. **Stomatologija**, v. 17, p. 54-66. 2015.

Goldman, E.; Green, L. H. **Practical handbook of microbiology**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015. 1055 p.

Gornitsky, M.; Paradisl, I.; Landaverde, G.; *et al.* A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. **J Can Dent Assoc**, v. 68, n. 1, p. 39-45, jan. 2002.

Gowri, S.; Gandhi, R. R.; Sundrarajan, M. Structural, optical, antibacterial and antifungal properties of zirconia nanoparticles by biobased protocol. **J Mater Sci Technol**, v. 30, n. 8, p. 782-790, ago. 2014.

Gulati, M.; Nobile, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes Infect**, v. 18, n. 5, p. 310-321, mai. 2016.

- Hamed-Rad, F.; Ghaffari, T.; Rezaii, F.; *et al.* Effect of nanosilver on thermal and mechanical properties of acrylic base complete dentures. **J Dent (Tehran)**, v. 11, n. 5, p. 495-505, set. 2014.
- Hamid, S. K.; Alghamdi, L. A.; Alshahrani, F. A.; *et al.* In vitro assessment of artificial aging on the antifungal activity of PMMA denture base material modified with ZrO₂ nanoparticles. **Int J Dent**, v. 2021, p: 5560443, mai. 2021.
- Hannah, V. E.; O'Donnell, L.; Robertson, D.; *et al.* Denture stomatitis: causes, cures and prevention. **Prim Dent J**, v. 6, n. 4, p. 46-51, dez. 2017.
- Hashim, T.; Risan M. H.; Kadhom, M.; *et al.* Antifungal, antiviral, and antibacterial activities of silver nanoparticles synthesized using fungi: A review. **Lett Appl NanoBioSci**, v. 9, p. 1307-1312. 2020.
- IBGE, Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Projeções da população: Brasil e unidades da federação – revisão 2018. Rio de Janeiro: **Relatórios Metodológicos**, v. 40, 2018.
- Ishikawa, K. H.; Mayer, M. P. A.; Miyazima, T. Y.; *et al.* A multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers. **J Prosthodont**, v. 24, n. 3, p. 194-199, abr. 2015.
- Izumida, F. E.; Moffa, E. B.; Vergani, C. E.; *et al.* In vitro evaluation of adherence of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Streptococcus mutans* to an acrylic resin modified by experimental coatings. **Biofouling**, v. 30, n. 5, p. 525-533, abr. 2014.
- Jangra, S. L.; Stalin, L.; Dilbaghi, N.; *et al.* Antimicrobial activity of zirconia (ZrO₂) nanoparticles and zirconium complexes. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 12, n. 9, p. 7105-7112, set. 2012.
- Kabawat, M.; de Souza, R. F.; Badaro, M. M.; *et al.* Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. **Int J Prosthodont**, v. 27, n. 4, p. 311-319, jul./ago. 2014.
- Kamijo, K.; Mukai, Y.; Tominaga, T.; *et al.* Fluoride release and recharge characteristics of denture base resins containing surface pre-reacted glass-ionomer filler. **Dent Mater J**, v. 28, n. 2, p. 227-233, mar. 2009.
- Kanafani, Z. A.; Perfect, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impacts. **Antimicrobiol Resist**, v. 46, n. 1, p. 120-128, jan. 2008.
- Karam, L.; Jama, C.; Mamede, A.; *et al.* Nisin-activated hydrophobic and hydrophilic surfaces: assessment of peptide adsorption and antibacterial activity against some food pathogens. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, n. 24, p. 10321-8, dez. 2013.
- Kasraei, S.; Sami, L.; Hendi, S.; *et al.* Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. **Restor Dent Endod**, v. 39, n. 2, p. 109-114, mai. 2014.

- Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Kelly, D. E.; *et al.* Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. **FEBS Lett**, v. 400, n. 1, p. 80-82, jan. 1997.
- Koroglu, A.; Sahin, O.; Dede, D. O.; *et al.* Effect of different surface treatment methods on the surface roughness and color stability of interim prosthodontic materials. **J Prosthet Dent**, v. 115, n. 4, p. 447-455, abr. 2016.
- Kraft-Bodi, E.; Jørgensen, M. R.; Keller, M. K.; *et al.* Effect of probiotic bacteria on oral *Candida* in frail elderly. **J Dent Res Clin Res Supplement**, v. 94, n. suppl.no.2, p.181S-186S, set. 2015.
- Kritikos, A.; Neofytos, D.; Khanna, N.; *et al.* Accuracy of Sensititre Yeast One echinocandins epidemiological cut-off values, identification of FKS mutant *Candida albicans* and *Candida glabrata*: a ten year national survey of the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS). **Clin Microbiol Infect**, v. 24, n. 1, p. e1211-e1214, nov. 2018.
- Kucharíková, S.; Tournu, H.; Lagrou, K.; *et al.* Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 9, p. 1261-1269, set. 2011.
- Kuhn, D. M.; Balkis, M.; Chandra, J.; *et al.* Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 506-508, jan. 2003.
- Kuhn, D. M.; George, T.; Chandra, J.; *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 6, p. 1773-1780, jun. 2002.
- Kumamoto, C. A. *Candida* biofilms. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 608-611, dez. 2002.
- Kurita, N.; Miyaji, M.; Kurane, R.; *et al.* Antifungal activity of components of essential oils. **Agric Biol Chem**, v. 45, n. 4, p. 945-952. 1981.
- Lazarin, A. A.; Machado, A. L.; Zamperini, C. A.; *et al.* Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. **Arch Oral Biol**, v. 58, n. 1, p. 1-9, jan. 2013.
- Lazarin, A. A.; Zamperini, C. A.; Vergani, C. E.; *et al.* *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an in vitro study. **Gerodontology**, v. 31, n. 1, p. 25-33, jul. 2012.
- Lee, B.; Lee, M. J.; Yun, K.; *et al.* Silver nanoparticles induce reactive oxygen species-mediated cell cycle delay and synergistic cytotoxicity with 3-bromopyruvate in *Candida albicans*, but not in *Saccharomyces cerevisiae*. **Int J Nanomedicine**, v. 14, p. 4801-4816, jul. 2019.

- Li, Z.; Sun, J.; Lan, J.; *et al.* Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilm formation. **Gerodontology**, v. 33, n. 2, p. 209–216, jun. 2016.
- Limírio, J. P. J. de O.; Gomes, J. M. de L.; Rezende, M. C. R. A.; *et al.* Mechanical properties of polymethyl methacrylate as a denture base: Conventional versus CAD-CAM resin - a systematic review and meta-analysis of in vitro studies. **J Prosthet Dent**, v. S0022-3913, n. 21, p. 00166-00169, mai. 2021.
- Liu, Y.; Zhao, Q. Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. **Biophys Chem**, v. 117, n. 1, p. 39-45, ago. 2005.
- Lohse, M. B.; Gulati, M.; Johnson, A. D.; *et al.* Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nat Rev Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 19-31, out. 2018.
- Lyu, X.; Zhao, C.; Yan, Z-M.; *et al.* Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 1161-1171, mar. 2016.
- Machmudah, S.; Widiyastuti, W.; Prastuti, O. P.; *et al.* Synthesis of ZrO₂ nanoparticles by hydrothermal treatment. **AIP Conference Proceedings**, v. 1586, n. 1, p. 166-172. 2014.
- Mandracci, P.; Mussano, F.; Rivolo, P.; *et al.* Surface treatments and functional coatings for biocompatibility improvement and bacterial adhesion reduction in dental implantology. **Coatings**, v. 6, n. 1, p. 7, jan. 2016.
- Martins, K. V.; Gontijo, S. M. de L. Treatment of denture stomatitis: Literature review. **Rev Bras Odontol**, v. 74, n. 3, p. 215-220, set. 2017.
- Mathé, L.; Dijck, P. V. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance. **Curr Genet**, v. 59, n. 4, p. 251-264, nov. 2013.
- Monsenego, P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study 'in vivo'. **J Oral Rehabil**, v. 27, n. 8, p. 708-713, ago. 2000.
- Morgan, T. D.; Wilson, M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. **J Appl Microbiol**, v. 91, n. 1, p. 47-53, jul. 2001.
- Nam, K-Y.; Lee, C-H.; Lee, C-J. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, p. e413-e419, jun. 2012.
- Neppelenbroek, K. H.; Pavarina, A. C.; Vergani, C. E.; *et al.* Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. **J Prosthet Dent**, v. 93, n. 2 p. 171-176. 2005.

- Newton, A. V. Denture sore mouth: a possible etiology. **Br Dent J**, v.1, p. 357-60, mai. 1962.
- Nicholls, S.; MacCallum, D. M.; Kaffarnik, F. A.; *et al.* Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Fungal Genet Biol**, v. 48, n. 3, p. 297-305, mar. 2011.
- Nikawa, H.; Tomiyama, Y.; Hiramatsu, M.; *et al.* Bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* L8020 decreases the oral carriage of mutans streptococci and the burden of periodontal pathogens. **J Investig Clin Dent**, v. 2, n. 3, p. 187-196, ago. 2011.
- Nobile, C. J.; Johnson, A. D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annu Rev Microbiol**, v. 69, p. 71-92. 2015.
- Nomura, T.; Murakami, T.; Shimoyama, Y.; *et al.* Effects of denture adhesives on growth and morphological transformation of *Candida albicans*. **J Prosthodont Res**, v. 64, n. 1, p. 78-84. 2020.
- Odds, F. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 272-279, jun. 2003.
- Oksala, E. Factors predisposing to oral yeast infections. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 48, n. 1, p. 71-74, fev. 1990.
- Pagonis, T. C.; Chen, J.; Fontana, C. R.; *et al.* Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. **J Endod**, v. 36, n. 2, p. 322-328, fev. 2010.
- Pappas, P. G.; Kauffman, C. A.; Andes, D.; *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious **Diseases Society of America**. *Clin Infect Dis*, v. 48, n. 5, p. 503-535. 2009.
- Park, S. E.; Blissett, R.; Susarla, S. M.; *et al.* *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. **J Prosthodont**, v. 17, n. 5, p. 365-369, jul. 2008.
- Park, S. E.; Periathamby, A. R.; Loza, J. C. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. **J Prosthodont**, v. 12, n. 4, p. 249-254, dez. 2003.
- Pattanaik, S.; Vikas, B. V. J.; Pattanaik, B.; *et al.* Denture stomatitis: a literature review. **J Indian Acad Oral Med Radiol**, v. 22, n. 3, p. 136-140. 2010.
- Pavarina, A. C.; Neppelenbroek, K. H.; Guinesi, A. S.; *et al.* Effect of microwave disinfection on the flexural strength of hard chairside reline resins. **J Dent**, v. 33, n. 9, p.741-748, out. 2005.
- Peleg, A. Y.; Hogan, D. A.; Mylonakis, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 340-349, mai. 2010.

- Peltzer, K.; Hewlett, S.; Yawson, A. E.; *et al.* Prevalence of loss of all teeth (edentulism) and associated factors in older adults in China, Ghana, India, Mexico, Russia and South Africa. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 11, p. 11308-11324, out. 2014.
- Pereira, R.; Fontenelle, R. dos S. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation, and resistance. **J Appl Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, nov. 2020.
- Perlin, D. S. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? **Curr Opin Infect Dis**, v. 22, n. 6, p. 568-573, dez. 2009.
- Perlin, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resist Updat**, v. 10, n. 3, p. 121-130, jun. 2007.
- Permán, J.; Cantón, E.; Espinel-Ingroff, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, n. 4, p. 453-460, mai. 2009.
- Pfaller, M. A.; Diekema, D. J.; Turnidge, J. D.; *et al.* Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species from 1997-2016. **Open Forum Infect Dis**, v. 6, n. suppl 1, p. S79-S94, mar. 2019.
- Pina, G. de M. S.; Lia, E. N.; Berretta, A. A.; *et al.* Efficacy of propolis on the denture stomatitis treatment in older adults: A multicentric randomized trial. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 8971746, mar. 2017.
- Pinelli, L. A. P.; Montandon, A. A. B.; Corbi, S. C. T.; *et al.* *Ricinus communis* treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. **J Oral Rehabil**, v. 40, n. 5, p. 375-380, fev. 2013.
- Pinto, T. M. S.; Neves, A. C. C.; Leão, M. V. P.; *et al.* Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida spp.* in complete denture wearers. **J Appl Oral Sci**, v. 16, n. 6, p. 385-390, nov./dez. 2008.
- Porenczukl, A.; Grzeczkwicz, A.; Maciejewska, I.; *et al.* An initial evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a disinfection liquid containing silver nanoparticles alone and combined with a glass-ionomer cement and dentin bonding systems. **Adv Cli Exp Med**, v. 28, n. 1, p. 75-83, jan. 2019.
- Porwal, A.; Khandelwal, M.; Punia, V.; *et al.* Effect of denture cleansers on color stability, surface roughness, and hardness of different denture base resins. **J Indian Prosthodont Soc**, v. 17, n. 1, p. 61-67, jan./mar. 2017.
- Prasad, R.; Banerjee, A.; Khandelwal, N. K.; *et al.* The ABCs of *Candida albicans* Multidrug Transporter Cdr1. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 12, p. 1154-1164, dez. 2015.
- Priyadarsini, S.; Mukherjee, S.; Mishra, M. Nanoparticles used in dentistry: a review. **J Oral Biol Craniofacial Res**, v. 8, n. 1, p. 58-67, jan./abr. 2018.

- Ramage, G.; Martínez, J. P.; López-Ribot, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 7, p. 979-986, nov. 2006.
- Ramage, G.; Tomsett, K.; Wickes, B. L.; *et al.* Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 98, n. 1, p. 53-59, jul. 2004.
- Ramage, G.; Vandewalle, K.; Wickes, B. L.; *et al.* Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 4, p. 163-170, dez. 2001.
- Redding, S.; Bhatt, B. B.; Rawls, H. R.; *et al.* Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.107, n. 5, p. 669-672, mai. 2009.
- Reichart, P. A. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 28, n. 5, p. 390-398, out. 2000.
- Řičicová, M.; Kucharíková, S.; Tournu, H.; *et al.* *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 3, p. 909-919, mar. 2010.
- Rodriguez-Tudela, J. L.; Alcazar-Fuoli, L.; Cuesta, I.; *et al.* Clinical relevance of resistance to antifungals. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 2, p. S111–S113, nov. 2008.
- Sagadevan, S.; Podder, J.; Das, I. Hydrothermal synthesis of zirconium oxide nanoparticles and its characterization. **J Mater Sci: Mater Electron**, v. 27, p. 5622-5627, fev. 2016.
- Sahin, O.; Koroglu, A.; Dede, D. O.; *et al.* Effect of surface sealant agents on the surface roughness and color stability of denture base materials. **J Prosthet Dent**, v. 116, n. 4, p. 610-616, out. 2016.
- Sawada, T.; Sawada, T.; Kumasaka, T.; *et al.* Self-cleaning effects of acrylic resin containing fluoridated apatite-coated titanium dioxide. **Gerodontology**, v. 31, n. 1, p. 68-75, mar. 2014.
- Schlecht, L. M.; Peters, B. M.; Krom, B. P.; *et al.* Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. **Microbiology**, v. 161, n. Pt 1, p. 168-181, jan. 2015.
- Seneviratne, C. J.; Silva, W. J.; Jin, L. J.; *et al.* Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Arch Oral Biol**, v. 54, n. 11, p. 1052-1060, nov. 2009.
- Shamsolketabi, S.; Nili, M. The effect of denture adhesive on the efficiency of complete denture in patients with different alveolar ridges. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 15, n. 4, p. 271-275, jul./ago. 2018.

- Singh, S.; Palaskar, J. N.; Mittal, S. Comparative evaluation of surface porosities in conventional heat polymerized acrylic resin cured by water bath and microwave energy with microwavable acrylic resin cured by microwave energy. **Contemp Clin Dent**, v. 4, n. 2, p. 147-151, abr. 2013.
- Song, W.; Ge, S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. **Molecules**, v. 24, n. 6, p.1033, mar. 2019.
- Soysa, N. S.; Ellepola, A. N. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. **Oral Dis**, v. 11, n. 5, p. 268-273, set. 2005.
- Soysa, N. S.; Samaranayake, L. P.; Ellepola, A. N. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. **Oral Oncology**, v. 40, n. 10, p. 971-8, nov. 2004.
- Soysa, N. S.; Samaranayake, L. P.; Ellepola, A. N. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. **Diabet Med**, v. 23, n. 5, p. 455-459, mai. 2006.
- Suganya, S.; Ahila, S. C.; Kumar, B. M.; *et al.* Evaluation and comparison of anti-*Candida* effect of heat cure polymethylmethacrylate resin enforced with silver nanoparticles and conventional heat cure resins: an in vitro study. **Indian J Dent Res**, v. 25, n. 2, p. 204-220, mar./abr. 2014.
- Taff, H. T.; Mitchell, K. F.; Edward, J. A.; *et al.* Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiol**, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, out. 2013.
- Taweechaisupapong, S.; Klanrit, P.; Singhara, S.; *et al.* Inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. **J Ethnopharmacol**, v. 106, n. 3, p. 414-417, jul. 2006.
- Teughels, W.; Van Assche, N.; Sliepen, I.; *et al.* Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. Suppl 2, p. 68-81, out. 2006.
- Tobudic, S.; Lassnigg, A.; Kratzer, C.; *et al.* Antifungal activity of amphotericin B, caspofungin and posaconazole on *Candida albicans* biofilms in intermediate and mature development phases. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 208-214, mai. 2010.
- Totu, E. E.; Nechifor, A. C.; Nechifor, G.; *et al.* Poly(methyl methacrylate) with TiO₂ nanoparticles inclusion for stereolithographic complete denture manufacturing – the future in dental care for elderly edentulous patients? **J Dent**, v. 59, p. 68-77, abr. 2017.
- Tournu, H.; Van Dijck, P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 1-16, nov. 2012.
- Tsui, C.; Kong, E. F.; Jabra-Rizk, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathog Dis**, v. 74, n. 4, p. 1-13, jun. 2016.

- Tsuji, M.; Ueda, T.; Sawaki, K.; *et al.* Biocompatibility of a titanium dioxide-coating method for denture base acrylic resin. **Gerodontology**, v. 33, n. 4, p. 539-544, dez. 2016.
- Tsutsumi, C.; Takakuda, K.; Wakabayashi, N. Reduction of *Candida* biofilm adhesion by incorporation of prereacted glass ionomer filler in denture base resin. **J Dent**, v. 44, p. 37-43, jan. 2016.
- Tyrovolas, S.; Koyanagi, A.; Panagiotakos, D. B.; *et al.* Population prevalence of edentulism and its association with depression and self-rated health. **Sci Rep**, v. 17, n. 6, p. 37083, nov. 2016.
- Uraivichaikul, D.; Boonsiri, I.; Wattanasirmkit, K. Effects of Palaseal® Coating Agent on Surface Roughness of Heat-polymerized Denture Base Acrylic Resins. **J Dent Assoc Thai**, v. 70, n. 1, jan. 2020.
- Valentini, F.; Luz, M. S.; Boscato, N.; *et al.* Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. **J Dent**, v. 41, n. 5, p. 420-427, mai. 2013.
- Vandeputte, P.; Ferrari, S.; Coste, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 1-26, dec. 2012.
- Veeraapandian, S.; Sawant, S. N.; Doble, M. Antibacterial and antioxidant activity of protein capped silver and gold nanoparticles synthesized with *Escherichia coli*. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, n. 1, p. 140-148, fev. 2012.
- Vila, T.; Sultan, A. S.; Montelongo-Jauregui, D.; *et al.* Oral candidiasis: a disease of opportunity. **J Fungi (Basel)**, v. 6, n. 1, p. 15, jan. 2020.
- Von Fraunhofer, J. A.; Loewy, Z. G. Factors involved in microbial colonization of oral prostheses. **Gen Dent**, v. 57, n. 2, p. 136-143. 2009.
- Waltimo, T.; Vallittu, P.; Haapasalo, M. Adherence of *Candida* species to newly polymerized and water-stored denture base polymers. **Int J Prosthodont**, v. 14, n. 5, p. 457-460, set./out. 2001.
- Wilson, J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. **Br Dent J**, v. 185, n. 8, p. 380-384, out. 1998.
- Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S. M.; *et al.* Nosocomial bloodstream infections in U.S. hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, v. 39, n. 3, p. 309-317, ago. 2004.
- Wuithschick, M.; Birnbaum, A.; Witte, S.; *et al.* Turkevich in new robes: key questions answered for the most common gold nanoparticle synthesis. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 7052-7071, jul. 2015.
- Xiao, L.; Madison, V.; Chau, A. S.; *et al.* Threedimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylases from *Aspergillus*

fumigatus and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 2, p. 568-574, fev. 2004.

Yamauchi, M.; Yamamoto, K.; Wakabayashi, M.; *et al.* In vitro adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture. **Dent Mater J**, v. 9, n. 1, p. 19-24, jun. 1990.

Yigit, N.; Aktas, E.; Dagistan, S.; *et al.* Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. **Eurasian J Med**, v. 43, n. 1, p. 27-32, abr. 2011.

Yodmongkol, S.; Chantarachindawong, R.; Thaweboon, S.; *et al.* The effects of silane-SiO₂ nanocomposite films on *Candida albicans* adhesion and the surface and physical properties of acrylic resin denture base material. **J Prosthet Dent**, v.112, n. 6, p. 1530-1538, dez. 2014.

Yoshijima, Y.; Murakami, K.; Kayama, S.; *et al.* Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 221-226, mai. 2010.

Zamperini, C. A.; Machado, A. L.; Vergani, C. E.; *et al.* Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. **Arch Oral Biol**, v 55, n. 10, p. 763-770, out. 2010.

Zarb, G. A.; Fenton, A. H. Prosthodontic treatment for edentulous patients. 13th ed. St. Louis: **Mosby/Elsevier**, 2012. p.133-140.

Zhang, Y.; Chen, Y. Y.; Huang, L.; *et al.* The antifungal effects and mechanical properties of silver bromide/cationic polymer nano-composite-modified poly-methyl methacrylate-based dental resin. **Sci Rep**, v. 7, p. 1547, mai. 2017.

Zhou, L.; Tong, Z.; Wu, G.; *et al.* Parylene coating hinders *Candida albicans* adhesion to silicone elastomers and denture bases resin. **Arch Oral Biol**, v. 55, n. 6, p. 401-409, jun. 2010.

Zomorodian, K.; Haghghi, N. N.; Rajaei, N.; *et al.* Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Med Mycol**, v. 49, n. 2, p. 208-211, fev. 2011.