

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS, BIOPOLÍMEROS E SUAS
ASSOCIAÇÕES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE
ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *Candida***

VANESSA ZAFANELI BERGAMO

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Keitel Donato

Porto Alegre

Março/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS, BIOPOLÍMEROS E SUAS
ASSOCIAÇÕES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE
ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *Candida***

Vanessa Zafaneli Bergamo
Farmacêutica Generalista (UFSM)
Mestre em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente, ênfase em Micologia (UFRGS)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Agrícola e do Ambiente/Ênfase em Micologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Keitel Donato

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Bergamo, Vanessa Zafaneli
PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS, BIOPOLÍMEROS E SUAS
ASSOCIAÇÕES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME
SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE Candida / Vanessa
Zafaneli Bergamo. -- 2018.

199 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Ricardo Keitel Donato.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. biofilme. 2. Candida. 3. antibiofilme. I.
Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II.
Donato, Ricardo Keitel, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“Por isso moldo a vida buscando nela a essência
Trilhando meu caminho conforme minha consciência
Um passo de cada vez e nunca maior que a perna
Não vai no rastro dos outros quem a si mesmo governa ”*

Leandro Zafaneli Benedetti

AGRADECIMENTOS

Descrever o que vivi desde a graduação até o doutorado não é fácil. Só foi possível chegar no doutorado devido a ajuda de varias pessoas. Quando cheguei na UFRGS (em 2011), a primeira pessoa que abriu as portas e me deu a oportunidade de começar minha vida na pós-graduação foi o Prof. Dr. George Gonzáles Ortega. Agradeço e sempre guardarei com muito carinho a oportunidade de conhecer essa pessoa incrível como você! Logo conheci o Prof. Dr. Alexandre Fuentefria, meu orientador, ao qual fui apresentada aos fungos/biofilmes!! Prof Alexandre, uma palavra resume todo o meu carinho por ti: GRATIDÃO!! Obrigada por ser este professor amigo, conselheiro e que não mede esforços para ver seus alunos bem! Um professor diferenciado, que muitas vezes em uma reunião conversávamos mais sobre a vida do que os experimentos (por mais professores assim!!). Sentirei muita saudade de te incomodar!! Ao Ricardo Donato e Katarzyna Donato, obrigada por todo o incentivo nas horas que mais precisei!! Aos demais colaboradores (Prof. Dr. Gustavo Silveira, Prof. Dr. Helder Teixeira, Prof. Dr. Saulo Fernandes, Prof. Dr. Mario Teixeira) obrigada pelas colaborações importantes para o meu trabalho!

Apesar de todo o aprendizado ao longo desta jornada, acredito que o maior legado que levamos do doutorado são os amigos! Ao nosso grupo GPMA, mais especificamente MICOGIRLS quero agradecer imensamente a todas (Gabi Machado, Bruna Pippi, Bruna Batista, Daiane, Leti, Luana, Paulinha, Tais, Vivi, Pri, Thamires), aos meninos (Anderson e Robson) por todos os momentos alegres compartilhados com muito café, chimarrão, e bolo no lab! Tenho certeza que vocês sentirão falta dos meus cantos! Agradeço também as pessoas do lab LDG e o William Lopes por todas as ajudas nas horas em que mais precisei! A Sabrina Beker e a Gabi (Albiero) que mesmo na distância, sempre torceram por mim! As Melittas, obrigada por fazerem meu carnaval feliz! A amizade de vocês é essencial na minha vida!! Gabi (Meirelles) obrigada por toda essa amizade e como sempre te disse: levarei além do doutorado!! À Keli, muito obrigada por fazer parte da minha família e da minha vida!

Não poderia deixar de escrever algumas linhas para uma pessoa que foi minha companheira do inicio ao fim desta jornada, né Pippi? Entramos juntas nessa loucura, sempre nos apoiando nas alegrias e nas tristezas!! Vivemos muitos momentos nesses 7 anos de amizade, como festas, junções, choros, ou um nada para fazer, mas sempre juntas (Bruna: “Vamos??”; eu: “Vamos!!”). Quero dizer que você foi essencial para o meu crescimento profissional e pessoal! Uma amiga que levarei para sempre no meu coração! O nosso maior medo é a falta do convívio diário, mas um fato é certo: amizade em que uma torce pela outra jamais perderá esse laço, pois você é minha irmã do coração! Obrigada por tudo! E conte sempre comigo!

Paulinha, não poderia também deixar de agradecer ao Saulo por você ter entrado no nosso lab. Uma pessoa que veio de “mansinho” e ao qual admiro essa tua humildade! Obrigada por milhares de áudios de 20 min para me dar forças nas horas em que mais precisei! Te levarei para sempre no meu coração!

Marinoca, o que seria dos enxaguantes sem você né!! Obrigada pelo teu profissionalismo! Obrigada por ter aparecido nessa tese e hoje sermos amigas! Você me ajudou a crescer profissionalmente e pessoalmente! Obrigada por tudo!

E quando se fala em família? Muitas vezes abrimos mão do aconchego e da vida simples do interior com o intuito de realizar nossos sonhos. Deixei meus pais tão cedo em busca de ser sempre o meu melhor e poder cuidar das minhas irmãs. Nossos pais não entendem o que é fazer um doutorado, mas o carinho e a torcida são infinitas, com tamanha alegria de nos ver crescendo profissionalmente. Obrigada mãe por todos os colos, comidas fartas, choros, por me entender nas horas em que nem eu mesma me aguentava de tão chata! Teu carinho e apoio foram essenciais em todos os momentos da minha vida! Pai, obrigada por todos os telefonemas, palavras de conforto e principalmente por acreditar em mim! Às minhas irmãs, obrigada pelo carinho de sempre!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a banca examinadora.

Por fim, dedico esta tese a minha irmã Fernanda, que com o seu jeito meigo e carismático me ensinou que não devemos ter medo das surpresas da vida. Devemos encarar a vida sempre agradecendo a Deus por tudo o que ele faz por nós! E ele faz milagres! Obrigada mana, obrigada por ser esse anjo na minha vida!!

PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS, BIOPOLÍMEROS E SUAS ASSOCIAÇÕES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *Candida*

Autor: Vanessa Zafaneli Bergamo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Keitel Donato

RESUMO: A incidência de infecções por espécies patogênicas de *Candida* vem crescendo e *Candida albicans* é a espécie que continua sendo a mais prevalente nas candidíases. Entretanto, observa-se o aumento no número de infecções por espécies emergentes de *Candida não-albicans* (CNA). Neste trabalho é avaliada a prospecção de novas moléculas e biopolímeros com atividade antifúngica e antibiofilme sobre cepas de *Candida*. Formulações de enxaguantes bucais foram desenvolvidas a partir do sal imidazólico cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (C₁₆MImCl) e selenocianatos alílicos **1-3**. As formulações de enxaguantes bucais contendo C₁₆MImCl na ausência ou presença de sorbato de potássio (F1, F2, respectivamente), apresentaram uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 50 µg/mL e os selenocianatos alílicos **1-3** apresentaram atividade antibiofilme pelo método cristal violeta (150 µg/mL). Os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) e corante (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) confirmaram que a formulação F2 exerceu um efeito antibiofilme similar ou mesmo maior do que F3 (presença de cloreto de cetilpiridínio - CP) e Colgate®. A formulação contendo selenocianatos alílicos **1 e 3**, ambos na ausência ou presença de sorbato de potássio, exibiram o mesmo nível de atividade antibiofilme para *C. tropicalis* (UFC/cm²). A técnica da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) avaliou as formulações contendo C₁₆MImCl e selenocianatos alílicos (**1-3**) sobre a resina acrílica e foram observadas ausência de arquitetura de biofilme e material de matriz extracelular. A técnica *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane* (HET-CAM) também foi empregada e os compostos em estudo não foram irritantes. Sugere-se que o C₁₆MImCl e os selenocianatos alílicos (**1-3**) são potentes candidatos a agentes antifúngicos e antibiofilmes para o desenvolvimento de formulações de enxaguantes bucais. Além disso, foram utilizados agentes antifúngicos comerciais, como anidulafungina (AND), Anfotericina (AMB), Cetoconazol (CTZ), Itraconazol (ITR), bem como C₁₆MImCl e o CP com o intuito de avaliar a susceptibilidade de *Candida* spp na presença dos polímeros (PVOH, álcool polivinílico altamente amorfo e PDDA, cloreto de poli(dialildimetilamônio) em diferentes proporções de polímero/fármaco (1:1, 99:1 e 1:99). O PVOH não apresentou CIMs capazes de inibir o crescimento de todos os fungos testados. Quando o PVOH foi associado, verificou-se a eficácia de quatro dos seis fármacos testados (CTZ, ITR, C₁₆MImCl e AND), mostrando também ampla atividade antifúngica contra *Candida* spp. Em alguns casos, em concentrações muito baixas quando comparadas aos fármacos puros. O PDDA em água apresentou atividade antifúngica. Seis antifúngicos (CTZ, ITR, CP, C₁₆MImCl, AND e AMB) apresentaram seu efeito antifúngico potencializado quando associado ao polímero catiônico (PDDA). Verificou-se mudança no potencial zeta, tamanho de partícula e estrutura do fármaco/polímero indicando a possível formação de micelas que solubilizam os fármacos em água. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam fortes candidatos para a aplicação em várias áreas biomédicas, possibilitando o uso de uma série de fármacos antifúngicos de diferentes classes.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (200 p.) março, 2018.

PROSPECTION OF NEW MOLECULES, BIOPOLYMERS AND THEIR ASSOCIATIONS WITH ANTIFUNGAL AND ANTIBIOFILME ACTIVITY ON *Candida* PATHOGENIC SPECIES

Author: Vanessa Zafaneli Bergamo

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-Advisor: Prof. Dr. Ricardo Keitel Donato

ABSTRACT: The incidence of infections by pathogenic species of *Candida* has been increasing and *Candida albicans* is the species that continues being the most prevalent in candidiasis. However, the number of other species of *Candida non-albicans* (CNA) is now higher. This work aims to evaluate the prospection of new molecules and biopolymers with antifungal activity and antibiofilm on strains of *Candida*. Mouthwashes formulations have been developed from the imidazolium salt 1-methyl-3-octylimidazole chloride (C₁₆MImCl) and for allylic selenocyanates **1-3**. The mouthwash formulations containing C₁₆MImCl in the absence or presence of potassium sorbate (F1, F2, respectively) presented a Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of 50 µg/mL and the allylic selenocyanates **1-3** presented antibiofilm activity by crystal violet method (150 µg/mL). Both the colony forming units (CFU/mL) and (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) results confirmed that the F2 formulation exerted a similar antibiofilm effect or even greater than F3 (presence of the cetylpyridinium chloride compound - CP) and Colgate®. The data obtained for formulations containing the allylic selenocyanates (**1-3**) indicated that formulations containing **1** and **3** (both in the absence or presence of potassium sorbate) exhibited the same level of antibiofilm activity for *C. tropicalis* (in CFU/cm²). The Scanning electron microscopy (SEM) technique evaluated the formulations containing C₁₆MImCl and allylic selenocyanates (1-3) on the acrylic resin and showed no biofilm architecture and extracellular matrix material. The *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane* (HET-CAM) technique was employed and the compounds under study were not irritating. It is suggested that C₁₆MImCl and allyl selenocyanates (**1-3**) are potent candidates for antifungal and antibiofilms agents for the development of mouthwashes formulations. In addition, commercial antifungal agents as Anidulafungin (AND), Anfotericin (AMB), Ketoconazole (CTZ), Itraconazole (ITR), as well as C₁₆MImCl and CP were used in order to evaluate the susceptibility of *Candida* spp in the presence or absence of polymers (PVOH, highly amorphous polyvinyl alcohol and PDDA, poly diallyl dimethyl ammonium chloride) in different polymer/drug ratios (1:1; 99:1 and 1:99). PVOH did not present MICs capable of inhibiting the growth of all fungi tested. When PVOH was associated the efficacy of four of the six drugs tested (CTZ, ITR, C₁₆MImCl and AND) was demonstrated, showing broad antifungal activity against *Candida* spp. In some cases, in very low concentrations when compared to pure drugs. PDDA in water showed antifungal activity. Six antifungals (CTZ, ITR, CP, C₁₆MImCl, AND and AMB) had their antifungal effect potentiated when associated with the cationic polymer (PDDA). Change in zeta potential, particle size and structure of the drug/polymer indicating the possible formation of micelles that solubilize the drugs in water. The results obtained in this work show strong candidates for the application in several biomedical areas, allowing the use of a series of antifungal drugs of different classes.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (200 p.) março, 2018.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Fungos patógenos oportunistas e sua resistência aos antifúngicos ...	5
3.2 Gênero <i>Candida</i>	6
3.3 Mecanismo de ação aos antifúngicos e Resistência do gênero <i>Candida</i>	9
3.4 Biofilme de <i>Candida</i> sobre próteses dentárias.....	11
3.4.1 Estrutura do biofilme fúngico	14
3.4.2 Estomatite protética causada por <i>Candida</i>	18
3.5 Resistência do biofilme de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos.....	23
3.6 O tratamento convencional e novas moléculas para uso odontológico em micoses orais oportunistas.....	25
3.6.1 Sais imidazólicos e Líquidos Iônicos	31
3.6.2 Selenocianatos alílicos.....	34
3.7 Biomateriais com atividade anti- <i>Candida</i>	35
3.8 Reativação de antifúngicos com polímeros biocompatíveis	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Amostras utilizadas para o estudo dos enxaguantes bucais	43
4.1.1 Cepas	43
4.1.2 Preparo dos compostos C ₁₆ MImCl e selenocianatos alílicos	43
4.2 Teste de Suscetibilidade do C ₁₆ MImCl frente as células planctônicas	44
4.2.1 Preparação do inóculo.....	44
4.2.2 Microdiluição em caldo.....	44
4.3 Ensaio de formação do biofilme em microplacas de 96 poços	45
4.4 Ensaio da atividade antibiofilme em microplacas de 96 poços	45
4.5 Preparação dos enxaguantes bucais	46
4.6 Atividade Antibiofilme em resinas acrílicas	48
4.6.1 Formação do biofilme e avaliação da atividade antibiofilme das formulações.....	48
4.6.2 Ensaio da formação do biofilme e avaliação da atividade antibiofilme em	

corpos de prova com a utilização do corante MTT.....	50
4.7 Análise ultraestrutural do biofilme de <i>Candida tropicalis</i> na superfície da resina acrílica usando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
4.8 Avaliação da Hipoalergenicidade (HET-CAM).....	51
4.9 Amostras utilizadas para o estudo de associação polímero/fármaco	52
4.9.1 Cepas	52
4.9.2 Preparação das soluções dos polímeros (PVOH e PDDA) e dos fármacos antifúngicos.....	53
4.9.3 Teste de Suscetibilidade aos agentes antifúngicos	53
4.9.4 Leitura dos resultados	54
4.10 Avaliação do Potencial Zeta	55
4.11 Microscopia Óptica e Espectroscopia Raman	55
5. ARTIGOS.....	57
5.1 Artigo 1	57
5.2 Artigo 2	81
5.3 Artigo 3	103
5.4 Resultados não apresentados na forma de artigo.....	142
6. DISCUSSÃO GERAL	154
7. CONCLUSÃO	161
8. PERSPECTIVAS	163
9. REFERÊNCIAS	164

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classe e mecanismo de ação dos antifúngicos	10
Tabela 2. Componentes e proporções para a preparação dos enxaguantes bucais na presença ou ausência do composto cloreto de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólico	47
Tabela 3. Componentes e proporções para a preparação dos enxaguantes bucais na presença ou ausência dos selenocianatos alílicos	48
Tabela 4. CIM dos agentes antifúngicos Anidulafungina, Anfotericina B, Cetoconazol, Itraconazol, C ₁₆ MImCl e Cloreto de Cetilpiridínio na presença ou ausência dos polímeros PVOH e PDDA	146

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Etapas da formação do biofilme fúngico de <i>Candida albicans</i>	15
Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme de <i>Candida tropicalis</i> aderido a prótese a base de resina acrílica	16
Figura 3. Aspecto clínico da estomatite protética de Classe 1 de Newton	19
Figura 4. Estrutura química de um sal imidazólico (Cloreto de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólico)	32
Figura 5. Estrutura dos selenocianatos alílicos	35
Figura 6. Estrutura química do álcool polivinílico modificado (PVOH)	41
Figura 7. Estrutura química do cloreto de poli(dialildimetilamônio)	42
Figura 8. Esquema da atividade antibiofilme com corpo de prova	49
Figura 9. Preparação do teste HET-CAM e diferentes pontos finais avaliados: “tempo de hemorragia”, o “tempo de lise” e o “tempo de coagulação”	52
Figura 10. Carga do fármaco (CTZ, CP, AND, AMB, C ₁₆ MImCl, ITR) ou polímero (PVOH, PDDA) em água ou em associação (polímero/fármaco)	149
Figura 11. Avaliação tamanho da partícula/carga do fármaco (CTZ, CP, AND, AMB, C ₁₆ MImCl, ITR) em água ou em associação (polímero/fármaco) comparados aos valores de CIM obtidos frente a cepa de <i>C. albicans</i>	150
Figura 12. Interação polímero/fármaco através da espectroscopia Raman	152
Figura 13. Microscopia Óptica da AND (a), AMB (b), PVOH (c), PDDA (d), PVOH/AND (e), PDDA/AND (f), PVOH/AMB (g), PDDA/AMB (h); Dark Field, 40x.	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AND	Anidulafungin
AND	Anidulafungina
AMB	Anfotericin (AMB),
AMB	Anfotericina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AS	Agar Sabouraud
C ₁₆ MImCl	Cloreto de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazóico
CFU/mL	Colony Forming Units
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMC	Carboximetilcelulose
CNA	<i>Candida não-albicans</i>
DMH	N-halamina 5,5-dimetilhidantoína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DODAB	brometo de dioctadecildimetilamónio catiónico
EP	Estomatite Protética
HET-CAM	<i>Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane</i>
HPMC	hidroxipropilmetilcelulose
ITR	Itraconazole
ITR	Itraconazol
CTZ	Ketoconazole
CTZ	Cetoconazol
Lis	Líquidos Iônicos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MOPS	<i>morpholinepropansulfonic acid</i>
MTT	(brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
MTT	(3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PAA	ácido poliacrílico
PCL	Poli(caprolactona)

PDDA	Cloreto de poli(dialildimetilamônio)
PLA	Ácido polilático
PLGA	Copolímeros dos ácidos lático e glicólico
PMMA	Polimetilmetacrilato
PET	Polietileno tereftalato
PEVA	polietileno-coacetato de vinila
PEO	poli(óxido de etileno)
PEG	polietileno glicol
PEGF	ésteres de poliglicerol de ácidos graxos
PGA	ácido poliglicólico
PVA	álcool polivinílico
PVC	cloreto de polivinila
PVP	polivinilpirrolidona
PVOH	álcool polivinílico altamente amorfo
QSM	<i>quorumsensing</i> (QSM)
RPMI	caldo Roswell Park Memorial Institute
SEM	Scanning electron microscopy
TECNOCAT	Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
TSB	Caldo de Triptose de Soja
XTT	((2,3-Bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazolium-5-carboxanilida))
ZnO-NPs	nanopartículas de óxido de zinco

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, a incidência de infecções por espécies patogênicas de *Candida* vem crescendo e tornando-se de difícil tratamento devido ao aumento de doenças imunogênicas, o uso exagerado de fármacos imunossupressores e antibióticos, a desnutrição, distúrbios endócrinos, o uso generalizado de dispositivos médicos, e, por fim, a resistência aos antifúngicos (Garcia-Cuesta et al., 2014; Pea & Lewis, 2018).

Candida albicans é a espécie que continua sendo a mais prevalente nas candidíases, entretanto, há consenso do aumento da participação de infecções invasivas ocasionadas por *Candida* não-*albicans* (CNA). Dentre as CNA incluem *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. lusitanae* (Chandra & Mukherjee, 2015). A patogenicidade das espécies de *Candida* é mediada por uma série de fatores de virulência, incluindo a capacidade de evadir as defesas do hospedeiro, a produção de enzimas hidrolíticas prejudiciais aos tecidos (por exemplo, proteases, fosfolipases e hemolisinas), aderência e formação de biofilmes no tecido hospedeiro, bem como dispositivos médicos (Silva et al., 2012). Biofilmes são comunidades microbianas altamente organizadas e incorporadas em uma matriz extracelular auto-segregada (Pierce et al., 2017). A formação de biofilmes também está relacionada a um elevado nível de resistência antifúngica dos microrganismos associados. Sobre os biofilmes microbianos de *Candida*, as células sésseis são mais resistentes aos agentes antifúngicos do que as células planctônicas (forma livre de desenvolvimento do microrganismo), uma vez que o avanço da resistência aos medicamentos tem sido associado ao processo de maturação do biofilme (Ramage et al., 2012).

Desta forma há uma grande necessidade para a prospecção de novos compostos antifúngicos que apresentem atividade e baixa toxicidade. Diante disso, o sal imidazólico cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico (C₁₆MIImCl), os selenocianatos alílicos e os biopolímeros Álcool Polivinílico Altamente Amorfo (PVOH) e cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) vem sendo estudados para tal finalidade. Estudos na literatura relatam a ação efetiva do C₁₆MIImCl como

agente antifúngico e antibiofilme frente as espécies de *Candida* (Bergamo et al., 2015a, 2015b). Além disso, os resultados recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que os selenocianatos alílicos, o isómero de selênio dos tiocianatos alílicos, apresentam altas propriedades antifúngicas contra espécies de *Candida*, dermatófitos e *Fusarium* (Batista et al., 2017; Silveira et al., 2017).

Uma outra abordagem alternativa e versátil, e ainda pouco explorada em termos de atividade antifúngica, é a associação entre biopolímeros (como PVOH e PDDA) e fármacos. O PVOH é particularmente interessante devido a sua excelente facilidade em formar revestimentos e excelentes propriedades de barreira ao oxigênio. Devido a essas características, o PVOH é amplamente utilizado em aplicações em que são necessários materiais de alta barreira, tais como embalagens para alimentos ou medicamentos (Yan et al., 2015). Outro polímero vantajoso, PDDA foi descrito para várias aplicações técnicas e biomédicas (Lee et al., 2015).

Observando que os materiais utilizados na clínica médica são capazes de acumular biofilme fúngico leveduriforme, a utilização de um agente antifúngico tem grande potencial de prevenção. Portanto, a prospecção de novas moléculas, biopolímeros e suas associações com atividade antifúngica e antibiofilme sobre espécies patogênicas de *Candida* torna esta proposta inovadora por fornecer um vasto número de novas ferramentas para a resolução de um problema de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Prospectar novas moléculas, biopolímeros e suas associações com atividade antifúngica e antibiofilme sobre espécies patogênicas de *Candida* provenientes do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA).

2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a capacidade de formação do biofilme fúngico por cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* mediante utilização dos corantes Cristal Violeta e (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT), bem como da utilização do corpo de prova a base de resina acrílica (logUFC/cm²).

b) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do sal imidazólico C₁₆MImCl nas células planctônicas.

c) Determinar a capacidade de inibição do biofilme fúngico dos selenocianatos alílicos (1,2,3).

d) Realizar a preparação das formulações de enxaguantes bucais na presença ou ausência do C₁₆MImCl e dos selenocianatos alílicos (1,2,3).

e) Determinar a capacidade de inibição da formação do biofilme fúngico (logUFC/cm²), utilizando a resina acrílica como corpo de prova, das formulações de enxaguantes bucais na presença ou ausência do C₁₆MImCl e dos selenocianatos alílicos (1,2,3), comparadas com o Colgate PLAX FRESHMINT® e Listerine®, respectivamente.

f) Determinar a capacidade de inibição do biofilme fúngico do sal

imidazólico C₁₆MImCl em microplacas de 24 poços, utilizando o corante MTT.

g) Analisar o biofilme de *C. tropicalis* na superfície da resina acrílica usando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), bem como após o tratamento com as formulações dos enxaguantes bucais.

h) Avaliar a suscetibilidade de agentes antimicrobianos de diferentes classes, especificamente, anidulafungina, anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, bem como o C₁₆MImCl e cloreto de cetilpiridínio (fármacos iônicos), na presença ou ausência de polímero neutro álcool polivinílico altamente amorfo (PVOH) ou iônico cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA).

i) Analisar o efeito da combinação polímero/fármaco (1:1) sobre o potencial zeta.

j) Avaliar o efeito da combinação entre fármaco (anfotericina B e anidulafungina) e o polímero (PVOH e PDDA) na morfologia e interface (interação, dispersão) utilizando Microscopia Óptica de luz polarizada e espectroscopia Raman.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fungos patógenos oportunistas e sua resistência aos antifúngicos

O gênero *Candida* pertence ao Reino Eumycota, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales e Família Saccharomycetaceae (Guarro, 2012). Muitas espécies fúngicas que eram não patogênicas estão emergindo como patógenos oportunistas e isso se deve aos progressos dos cuidados médicos, os quais melhoram a sobrevivência de pacientes em situação de risco e, portanto, aumentam a população de imunodeprimidos (Miceli et al., 2011). Das espécies de *Candida* isoladas de seres humanos, *C. albicans* é a mais prevalente nas condições saudáveis e de doença. No entanto, enquanto os estudos micológicos demonstraram que *C. albicans* representa mais de 80 % dos isolados de todas as formas de candidoses, nas últimas duas décadas, o número de infecções por CNA aumentaram significativamente (Silva et al., 2012).

As espécies de CNA não eram frequentemente encontradas no diagnóstico laboratorial e foram as primeiras leveduras caracterizadas como emergentes (Miceli et al., 2011). *Candida* spp. estão presentes em várias regiões do corpo humano compondo sua microbiota normal, tais como a pele, as unhas e o leito subungueal, os tratos genital e gastrointestinal, as mucosas oral e nasal (Barbedo & Sgarbi, 2010; Costa et al., 2011; Miceli et al., 2011; Delaloye & Calandra, 2014). Essa colonização é importante para o hospedeiro pois limita o crescimento de outros fungos oportunistas e acarreta a constante ativação da imunidade celular (Martins et al., 2014). Todavia, quando há uma extrusão no balanço normal da microbiota ou os mecanismos de defesa do hospedeiro apresentam-se comprometidos, essas espécies tendem a expressar sua virulência, tornando-se patogênicas, ocasionando a candidíase (Costa et al., 2011; Miceli et al., 2011; Sardi et al., 2013). Assim, as condições que predisõem as infecções por *Candida* spp. são a colonização da pele e mucosas por essas leveduras e a modificação das barreiras naturais do hospedeiro que podem ser

ocasionadas por feridas, cirurgias, inserção de cateteres intravasculares e urinários (Méan et al., 2008).

Recentemente, tem-se estudado as razões pelas quais a candidíase tem aumentado consideravelmente nos pacientes. Entre eles destacam-se o aumento de doenças imunogênicas, a utilização de fármacos imunossupressores e antibióticos, a desnutrição, distúrbios endócrinos, o uso generalizado de dispositivos médicos e a resistência aos antifúngicos (Negri et al., 2012; Yapar, 2014, Fuentesfria et al., 2018; Pea & Lewis, 2018). A resistência aos antifúngicos é designada como um importante problema de saúde pública (Clark & Hajjeh, 2002, Tobudic et al., 2012) e é determinada como um processo baseado na seleção natural de fungos com maior capacidade de sobreviver e se desenvolver na presença dos agentes antifúngicos (Campoy & Adrio, 2017).

Outro dado importante sobre o problema peculiar da resistência dos fungos patogênicos se deve ao fato da semelhança da biologia celular eucariótica exibida por células fúngicas e aquelas de mamíferos que restringe a quantidade de antifúngicos descritos. Os fungos mutantes são simplesmente isolados e podem apresentar resistência a uma gama de antifúngicos. A quantidade restrita de fármacos antifúngicos torna este fenótipo um problema sério no tratamento das infecções ocasionadas por fungos (Gulshan & Moye-Rowley, 2007). Assim, a vivência da problemática resistência das espécies de CNA torna-se um grande desafio para a saúde pública.

3.2 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 200 espécies e é o maior gênero de leveduras de importância clínica (Brandt & Lockhart, 2012; Martins et al., 2014). Pfaller et al. (2015) mencionaram que as principais espécies de *Candida* associadas à candidíase sistêmica são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Estes microrganismos são responsáveis por 90% dos casos em todo mundo, embora outras espécies do gênero também estejam emergindo nos últimos anos, tais como *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. dubiniensis*, *C. lipolytica*, *C. pelliculosa*, *C.*

dublinensis, entre outras.

A espécie de *Candida* mais frequentemente associada à infecção fúngica é *C. albicans* (40 a 50% dos casos), contudo, CNA e outras leveduras raras emergiram como importantes patógenos oportunistas (Miceli et al., 2011; Quindós, 2014; Pfaller et al., 2015). Explica-se esse aumento das espécies de *Candida* spp. a ocasionar infecções fúngicas devido a epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), transplante de órgãos, quimioterapia, câncer e os efeitos iatrogênicos (Sanguinetti et al., 2015).

A prevalência de espécies de *Candida* varia de acordo com a localização geográfica, instituição, mistura de casos, risco do hospedeiro e prática clínica. Em nível mundial, *C. albicans* é o microrganismo mais frequentemente isolado de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos. Este fungo apresenta patogenicidade e fatores de virulência, incluindo a capacidade de aderir a vários epitélios e mucosas, além de apresentar estruturas filamentosas produtoras de dimorfismo que facilitam a invasão nos tecidos, termotolerância significativa e produção de enzimas como as proteases e fosfolipases (Hiller et al., 2011; Silva et al., 2012).

Candida glabrata ocupa o segundo lugar nos Estados Unidos, no Reino Unido, no norte da Europa (incluindo a Finlândia, Noruega e Dinamarca) e a Austrália. Exibe elevada prevalência em pacientes idosos e tem passado a existir como importante patógeno hospitalar, concebendo a segunda ou terceira espécie em casos de candidemia (Silva et al., 2012).

Candida parapsilosis é mais comum na América do Norte do que no país europeu e representa importante agente de candidemia, com ocorrência superior em crianças e recém-nascidos prematuros, e está associada à presença de cateter venoso central e uso de nutrição parenteral (Colombo et al., 2013; Fortún & Gioia, 2017).

Candida tropicalis é mais comum na Índia, Cingapura e Tailândia (46% dos pacientes hospitalizados com candidemia). É um agente oportunista no caso de pacientes neutropênicos e quando há supressão da microbiota bacteriana devido ao uso de antibióticos e a danos na mucosa do trato gastrointestinal. Além disso, *C. tropicalis* é a segunda ou terceira espécie

encontrada em casos de candidemia em pacientes com câncer (leucemia) e ocorre com menor frequência em pacientes com tumores sólidos (Colombo et al., 2013; Fortún & Gioia, 2017).

Candida krusei é patógeno hospitalar ocasional, isolado de pacientes com doenças hematológicas e pacientes transplantados. Sua alta ocorrência em pacientes neutropênicos com candidemia deve-se à exposição a fluconazol, pois esta espécie apresenta resistência intrínseca a este antifúngico. Os demais patógenos de candidíase sistêmica também apresentam peculiares características epidemiológicas e terapêuticas (Pfaller & Diekema, 2010; Colombo et al., 2013).

Em um estudo prospectivo e multicêntrico na França (2005-2006), de 136 pacientes com candidemia foi observado que 42,6% das infecções foram ocasionadas por CNA. *C. glabrata* foi considerada o segundo agente patógeno mais frequente (Leroy et al., 2010). Em uma outra análise retrospectiva com a adesão de 189 pacientes com candidemia em quatro Unidades de Terapia Intensiva (UTI) gerais na Grécia, Austrália, Bélgica e no Brasil, CNA foram avaliados em 44% dos casos (Holley et al., 2009).

No período de 2004 a 2008 foi realizado um estudo no Brasil (São Paulo, SP), no Hospital Brigadeiro onde foram analisados 50 casos de pacientes com fungemias e as espécies mais encontradas foram *C. parapsilosis* (26%), *C. tropicalis* (26%) e *C. albicans* (18%) (Pereira et al., 2010).

Na Colômbia foi realizado um estudo para descrever a epidemiologia das infecções por *Candida* em UTIs de uma rede de vigilância entre os anos de 2010 a 2013. Como resultado, os isolados de *Candida* constituíram 94,5% dos 2680 isolados de fungos considerados. Proporções semelhantes foram observados para *C. albicans* e CNA (48,3% e 51,7%, respectivamente). Entre estes últimos, *C. tropicalis* (38,6%) e *C. parapsilosis* (28,5%) foram as espécies mais frequentes (Motoa et al., 2017).

Em um outro estudo objetivou-se isolar e identificar espécies de *Candida* da cavidade oral de portadores de prótese com estomatite relacionada à dentadura que foram atendidos na Universidade Federal do Pará (Belém, Pará, Brasil). Foram incluídos 36 portadores de prótese com estomatite protética (EP).

C. albicans foi a espécie mais freqüentemente encontrada (78% dos casos), seguida de *C. famata* e *C. tropicalis* (Gauch et al., 2017).

Como verificado nas citações acima, as espécies de CNA estão emergindo como patógenos que ocasionam infecções fúngicas tanto em nível hospitalar quanto odontológico. Essa patogenicidade de CNA quando relacionada a essas enfermidades são de cuidado peculiar devido à virulência, patogenicidade de algumas espécies e à ocorrência de resistência aos antifúngicos disponíveis atualmente (Krcmery & Barnes, 2002; Fuentefria et al., 2018). Estas espécies de CNA são agora responsáveis por até 50% de todos os casos em alguns centros e estão associados a resistência intrínseca (*C. krusei*) ou susceptibilidades reduzidas a classe dos azóis (*C. glabrata*) ou a equinocandinas (*C. parapsilosis*) (Arendrup, 2010). As infecções fúngicas estão conexas às internações prolongadas, com alta taxa de mortalidade e aumento no custo hospitalar (Dignani et al., 2009; Nucci et al., 2010). Assim sendo, a evolução ou até a sobrevivência do paciente está sujeita da rápida identificação do patógeno e, conseqüentemente, da admissão precoce da terapia antifúngica (Wiederhold, 2017).

3.3 Mecanismo de ação aos antifúngicos e Resistência do gênero *Candida*

O episódio e a gravidade das infecções fúngicas tem aumentado expressivamente nas últimas décadas com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes imunodeprimidos (Chang et al., 2017; Fuentefria et al., 2018). Esse fato pode ser explicado pelo uso generalizado dos fármacos que estão trazendo conseqüências para o tratamento devido ao aparecimento de cepas resistentes e levando a falhas no tratamento (Tobudic et al., 2012).

Cinco são as classes de antifúngicos frequentemente utilizados e disponíveis em forma oral, tópica e intravenosa (Campoy & Adrio, 2017), a saber: azóis, equinocandinas, polienos, alilaminas e análogos de pirimidina (Flevari et al. 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Classe e mecanismo de ação dos antifúngicos

Classe	Mecanismo de ação	Antifúngicos
<i>Azóis</i>	Inibição da biossíntese de ergosterol da membrana fúngica.	Cetoconazol, econazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, albaconazol.
<i>Equinocandinas</i>	O alvo é a parede celular de fungos através da inibição da enzima β -1,3-D-glucana sintase, conduzindo à instabilidade osmótica e lise celular.	Caspofungina, micafungina, anidulafungina.
<i>Polienos</i>	Os polienos têm alta afinidade com o ergosterol da membrana fúngica, complexando-se e formando pequenos canais transmembranares, os quais alteram a permeabilidade da membrana.	Nistatina, anfotericina B
<i>Alilaminas</i>	Inibição alostérica da enzima fúngica esqualeno oxidase (codificada pelo gene ERG1), com bloqueio da conversão do esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno. Ocorre acúmulo de quantidades tóxicas de esqualeno e redução do ergosterol.	Terbinafina
<i>Análogos de pirimidina</i>	A flucitosina penetra na célula fúngica através da citocina aminase e em seguida é convertida em 5-fluororacil. Este inibe a enzima timidilato sintetase, que é o componente fundamental do ácido desoxirribonucleico (DNA), ausente nas células eucarióticas humanas.	5-fluorocitosina

Entretanto, os antifúngicos possuem limitações devido a problemas

com perfis de segurança, propriedades farmacocinéticas, efeitos colaterais e, por fim, problemas relacionados a resistência (Pianalto & Alspaugh 2016).

A ineficácia de resposta a terapia antifúngica é complexa e depende dos fatores associados aos microrganismos (resistência microbiológica) e hospedeiro (resistência clínica). A resistência do microrganismo é a falta de suscetibilidade do mesmo a um antimicrobiano. Esse tipo de resistência é avaliada por testes *in vitro* e o microrganismo é caracterizado como resistente quando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fármaco excede os limites de suscetibilidade para esse organismo. Além disso, a resistência microbiológica pode ser definida como intrínseca e extrínseca. A resistência intrínseca envolve um microrganismo que é tipicamente menos susceptível a um determinado antifúngico. Já a resistência extrínseca envolve o desenvolvimento da resistência em virtude da resposta à exposição a um agente antimicrobiano e é dependente da expressão genética alterada (Cowen et al. 2014; Fuentefria et al., 2018). A resistência clínica refere-se a uma infecção persistente mesmo o paciente recebendo terapia com antimicrobiano adequado (Tobudic et al., 2012). A resposta clínica satisfatória não depende apenas sobre a suscetibilidade do microrganismo, mas também do sistema imunológico do paciente, penetração e distribuição do fármaco e, por fim, a aderência do paciente ao tratamento correto (Cowen et al., 2014). Não obstante, durante a disseminação dos agentes antifúngicos, os microrganismos podem manter-se expostos aos fármacos em níveis subótimos, e conseqüentemente resultando em células que persistem durante a terapia ocasionando nova infecção (Campoy & Adrio, 2017).

3.4 Biofilme de *Candida* sobre próteses dentárias

Diversas espécies de *Candida* colonizam superfícies, tais como o trato digestivo, trato genital e a mucosa na cavidade oral, sendo, este último uma das regiões anatômicas que possui maior índice de colonização por microrganismos (Williams et al., 2013). Geralmente esses microrganismos localizados na boca não causam problemas em pessoas saudáveis (Arnaud et al., 2012), entretanto o excesso de crescimento de *Candida* na mucosa

orofaríngea ou esofágica ocasiona sensação de queimação, distúrbios do paladar, mucosite severa ou disfagia, resultando em má nutrição pelo paciente.

Além disso, quando ocorre uma situação de imunossupressão no indivíduo, as espécies de *Candida* podem apresentar potencial patogênico, ocasionando infecções superficiais e sistêmicas. As infecções ocasionadas por esse microrganismo na cavidade bucal são definidas como Candidíase bucal ou oral, especialmente em idosos ou em pacientes hospitalizados (Fanello et al., 2006). Nos pacientes que utilizam próteses (totais ou parciais), é denominada estomatite protética (EP), candidíase atrófica ou estomatite por prótese (Melo & Guerra, 2014).

Segundo uma pesquisa realizada em 2010 pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2011), o Brasil é considerado um país com alta taxa de edentados. Enquanto 13% dos adolescentes necessitam de próteses em um ou nos dois maxilares, 23,9% dos idosos necessitam de prótese total. Já nos adultos, esse percentual é estimado a cinco vezes mais alto que dos adolescentes.

As próteses dentárias são constituídas principalmente a base de resina acrílica e as mesmas favorecem a colonização de microrganismos. Traumas na mucosa bucal devido à má colocação da prótese e a má higiene bucal são fatores que se associam a processos patológicos na cavidade bucal. Estudos apontam que dos microrganismos que habitam a boca, a *C. albicans* se destaca pela sua relativa presença nas próteses totais. Entretanto, vale ressaltar que as espécies de CNA também vêm aumentando significativamente (Avrella & Goulart, 2008).

Para evoluir e se desenvolver no hospedeiro (sendo comensal ou patogênico), os microrganismos devem aderir e colonizar uma superfície. Essas superfícies podem ser, por exemplo, um biomaterial, a resina acrílica da prótese, ou a superfície da mucosa (Williams et al., 2013). A virulência do gênero *Candida* é atribuída a diversos fatores, tais como: aderência em células da mucosa ou dispositivos médicos, dimorfismo, produção de enzimas (proteínases e fosfolipases) e, por fim, a formação de biofilme (Cuéllar-Cruz et al., 2012; Silva et al., 2012).

Conforme a definição aplicada, o biofilme é considerado um grupo biológico sésil complexo de microrganismos, com alto grau organizacional aderidas a um substrato de forma irreversível, embebidas em uma matriz exopolimérica com estrutura complexa e heterogeneidade metabólica que possuem fenótipos distintos em comparação com células planctônicas (Kiedrowski & Horswill, 2011; Ramage et al., 2014). Uma gama de microrganismos (bactérias e fungos) são capazes de alternar crescimento planctônico (forma livre de desenvolvimento de um microrganismo) e crescimento em biofilme. Considera-se que 80% dos microrganismos existentes formam biofilme (Harriott & Noverr, 2011).

Os principais fatores que colaboram para a formação do biofilme são: superfície de contato, moléculas *quorum sensing* (QSM) e nutrientes (Fanning & Mitchell, 2012). Os biofilmes convivem em uma matriz feita fundamentalmente de polissacarídeos, contendo DNA e proteínas. Um biofilme também pode ser considerado um hidrogel, um polímero de alta complexidade contendo uma quantidade de água que corresponde a várias vezes seu peso seco. O biofilme pode ser formado por uma espécie ou vários grupos de microrganismos. Dentro dessa comunidade, os microrganismos são adequados a dividir nutrientes e são protegidos de fatores nocivos do meio ambiente. A proximidade estreita entre os microrganismos dentro das células sésseis (biofilme) também pode ter o benefício de promover a transmissão de informação genética por conjugação (Cruz et al. 2012; Tortora et al., 2012).

A importância de estudar os biofilmes se deve a preocupação com a saúde pública. Sabe-se que as espécies de *Candida* em uma estrutura de biofilme são 1.000 vezes mais resistentes aos agentes antifúngicos do que as células planctônicas (Ramage et al., 2012). Além disso, estima-se que 70% das infecções humanas envolvem a formação de biofilme ocasionadas por espécies de *Candida*. Em suma, os biofilmes se formam em grande parte nos dispositivos médicos, próteses, cateteres, implantes, entre outros (Nett et al., 2014; Zambrano et al., 2014).

As infecções fúngicas geram fatores de virulência e conseqüentemente ao desenvolvimento do biofilme. A presença do biofilme na

prótese dentária total é um dos fatores etiológicos da EP, sendo nocivo à mucosa oral bem como para a própria saúde do paciente (Sesma & Morimoto, 2011). Inicialmente, a limpeza de uma prótese dentária foi marcada por princípios estéticos, entretanto, a melhoria na saúde bucal tornam-se evidentes. O controle do biofilme deve ser efetivo através da higienização da prótese, pois a adesão dos microrganismos é beneficiada por superfícies irregulares e rugosas que reduzem a atividade dos agentes de limpeza (Oliveira et al., 2007). O enfoque para prevenção da formação de células sésseis fúngicas é a aplicação de antifúngicos na superfície nas quais esses microrganismos podem se aderir.

3.4.1 Estrutura do biofilme fúngico

Para o biofilme ser formado é necessário um substrato onde o microrganismo venha a se aderir. Esse substrato pode ser abiótico ou biótico. O substrato abiótico pode ser representado por materiais plásticos (por exemplo, as próteses dentárias formadas a base de resina acrílica). Já o substrato biótico são as superfícies de células compostas por tecidos colonizados por células sésseis (Madigan et al., 2010).

Os biofilmes formados em superfícies de próteses dentárias a base de resina acrílica são constituídos de polímeros que são híbridos acrílicos constituídos por uma mistura de Polimetilmetacrilato (PMMA), hidroxiapatita, resina de poliamida, poliuretano, policarbonato e polietileno tereftalato (PET) (De Freitas Fernandes et al., 2011).

De forma sucinta, a formação da estrutura do biofilme envolve a aderência da levedura na sua forma planctônica a um substrato, proliferação desses microrganismos com formação de hifas e pseudohifas, acúmulo da matriz exopolimérica com desenvolvimento do biofilme, e, por fim, libertação das células fúngicas que não se aderiram para o meio externo (Figura 1) (Chung; & Toh, 2014).

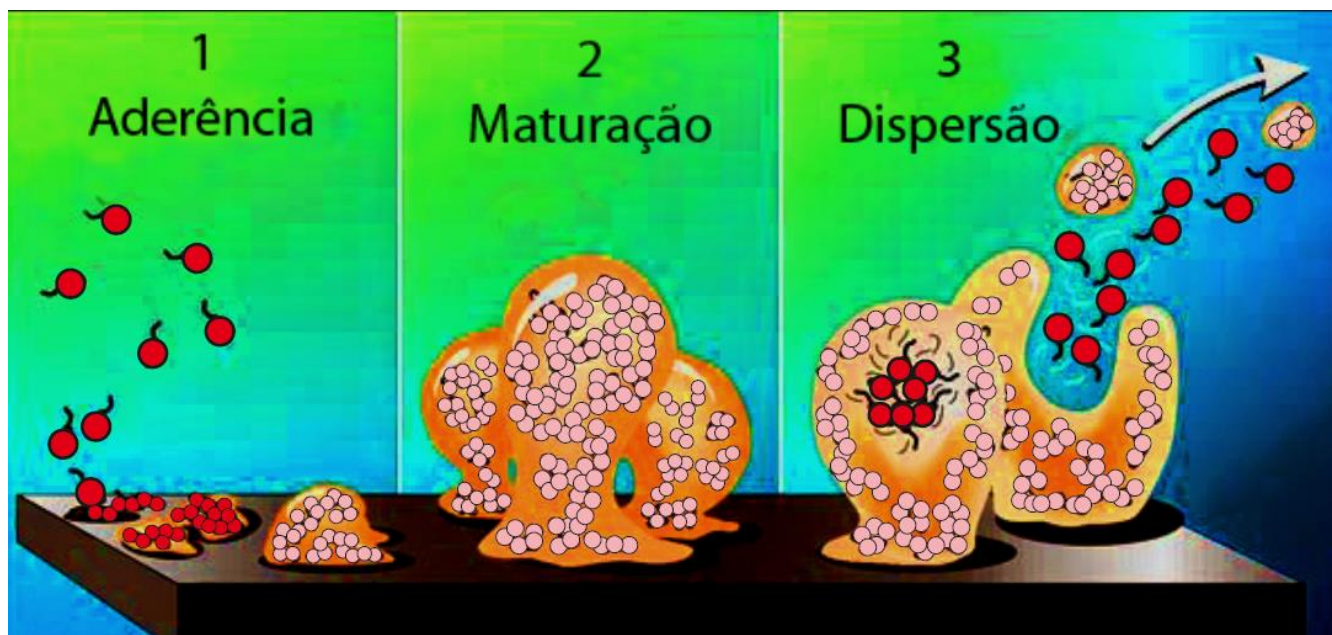


Figura 1. Etapas da formação do biofilme fúngico de *Candida albicans*. 1 – Aderência do microrganismo ao substrato; as células se replicam e começam a secretar matriz extracelular e formar as pseudo-hifas. 2 – O biofilme maduro é formado na presença de micro-colônias e hifas e da matriz polimérica extracelular que envolvem as células. 3 – As leveduras começam a dispersar do biofilme, disseminando a infecção e reinicia-se o ciclo novamente. (Fonte: dos autores).

A estrutura do biofilme na prótese dentária é composta por uma combinação de microrganismos (fungos e bactérias), células epiteliais que estão conectadas dentro de uma matriz mucopolissacarídica, ideal para a ligação da placa à superfície da prótese (Shinawi, 2017).

Para a formação do biofilme, essencialmente origina-se uma camada combinada de glicoproteínas e lipídios, constituída em um material colocado em contato com um ambiente líquido, necessário para o crescimento e adesão dos microrganismos. A prótese dentária a base de resina acrílica apresenta carga positiva e elevada energia de superfície. As glicoproteínas da saliva que apresentam carga negativa são atraídas ligeiramente formando uma estrutura semelhante à película adquirida ao dente, com elevada aderência química à prótese. A próxima etapa envolve a colonização de microrganismos que possuem carga negativa e se aproximam da película adquirida através de forças de van der Waals e se unem a ela por meio de adesinas e pontes de Hidrogênio.

Através disso, uma adesão mecânica é beneficiada pelas irregularidades e porosidades da resina (Sesma & Morimoto, 2011; Borghi, 2015) (Figura 2).

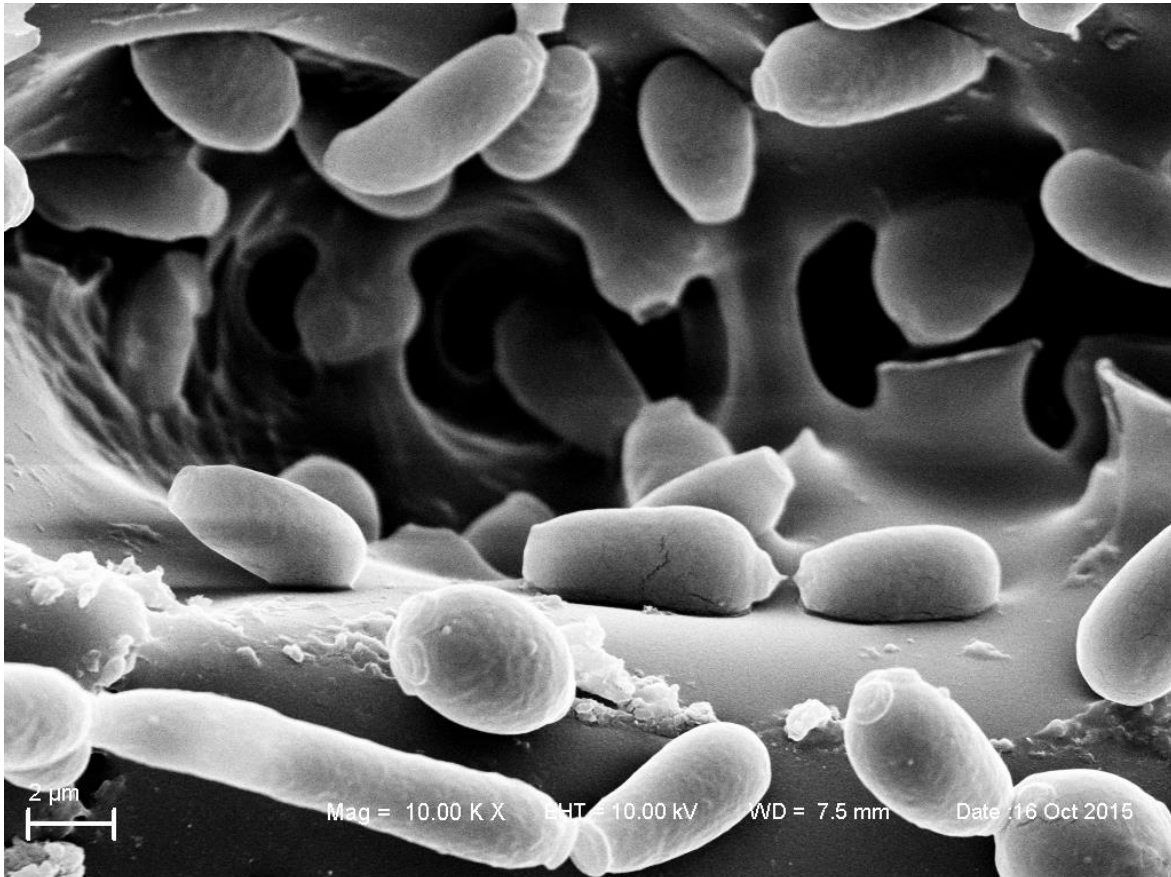


Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme de *Candida tropicalis* aderido a prótese a base de resina acrílica (Fonte: dos autores)

As adesinas são enzimas localizadas nos microrganismos que reconhecem receptores específicos na película adquirida ou nas células epiteliais da boca (Borghi, 2015; Ramage et al., 2012). Vários são os sintomas clínicos descritos pelos pacientes, tais como a dor, halitose, prurido e percepção de queimação. Isso pode acontecer pois a *C. albicans* tem a capacidade de produzir exoenzimas, constituídas principalmente por proteinases que facilitam a adesão do biofilme, associado a fatores do hospedeiro, tais como redução do pH, do fluxo salivar e da microbiota oral (Bergamo et al., 2016). Após a adesão,

ocorre a etapa de proliferação das formas hifais em torno da prótese dentária e desenvolvimento do complexo microbiano.

Dados da literatura relatam que a formação de biofilme de *C. albicans* ocorre principalmente após 24-48 h de crescimento e são constituídas de três fases: (a) adesão de blastoconídios para a superfície; (b) as leveduras se multiplicam para cobrir uma extensa área superficial e ocorre a produção dos polímeros extracelulares; e, por fim, (c) ocorre a fase de maturação (Harrison et al., 2007; Mathé & Van Dijck, 2013).

Devido as características irregulares e hidrofílicas da resina acrílica, o material usado para composição das próteses favorece a etapa inicial de adesão do microrganismo. Em seus estudos, Ramage et al. (2004) avaliaram o biofilme fúngico nos materiais em indivíduos com EP. Para tanto, submeteram fragmentos destas próteses a exame de microscopia eletrônica de varredura. Como resultado, encontraram uma intrincada rede de hifas e leveduras profundamente embutidas nas imperfeições, fendas e irregularidades da superfície dos fragmentos.

Em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* é evidente a observação de blastoconídios e pseudo-hifas. Essas espécies exibem uma estrutura do biofilme em monocamada compacta não contínua, entretanto os carboidratos e proteínas, a *C. parapsilosis* exibe maior quantidade. *C. parapsilosis* apresenta blastoconídios, entretanto *C. glabrata* observam-se somente blastoconídios com extenso número de carboidratos e proteínas em uma estrutura do biofilme em monocamada compacta ou multicamada (Silva et al., 2011).

A etapa final do ciclo de vida das células sésseis é conhecida como dispersão. Esse fenômeno ocorre entre 24 e 96 horas, dependendo da cepa de *Candida*, das condições do meio ambiente e dos agentes regulatórios). Na dispersão ocorre o rompimento das células fixadas na superfície que é ocasionada pela síntese de surfactantes e proteínas (adesinas) que rompem a matriz. Além disso, nessa fase as células fúngicas são liberadas para o meio externo e regressam para o seu modo planctônico. Sugere-se que a falta ou diminuição do oxigênio e de nutrientes dentro do biofilme maduro leva a fase de dispersão (Ramage et al. 2005). Portanto, estudos despontaram que os fatores

comumente encontrados para a etiologia da formação do biofilme envolvem a presença de fungos (*Candida* spp.), traumas na mucosa do paciente devido à má colocação da prótese, idade avançada, xerostomia, tabagismo, paciente imunodeprimido e higiene precária (Melo & Guerra, 2014).

3.4.2 Estomatite protética causada por *Candida*

A modificação patológica mais frequentemente notada na mucosa da boca devido a utilização de próteses dentárias removíveis, parciais ou totais é conhecida como estomatite induzida por prótese, Candidíase Atrófica Crônica ou Estomatite Protética (EP) (Lund et al., 2010). Sua prevalência pode variar de 17% a 77,5% entre os usuários de próteses totais, dependendo da população estudada (Gendreau & Loewy, 2011).

Clinicamente, a EP é localizada sob a base da prótese total, caracterizada pelo aspecto de diversos pontos hiperêmicos preferencialmente na mucosa que mantém contato direto com a superfície interna da prótese dentária (Figura 3). Em casos mais avançados, é possível denotar áreas eritematosas e hiperplasia papilar do palato (Pereira-Cenci et al., 2008; Corte-Real et al., 2011; Mima et al., 2011; Sesma & Morimoto, 2011; Melo & Guerra, 2014).

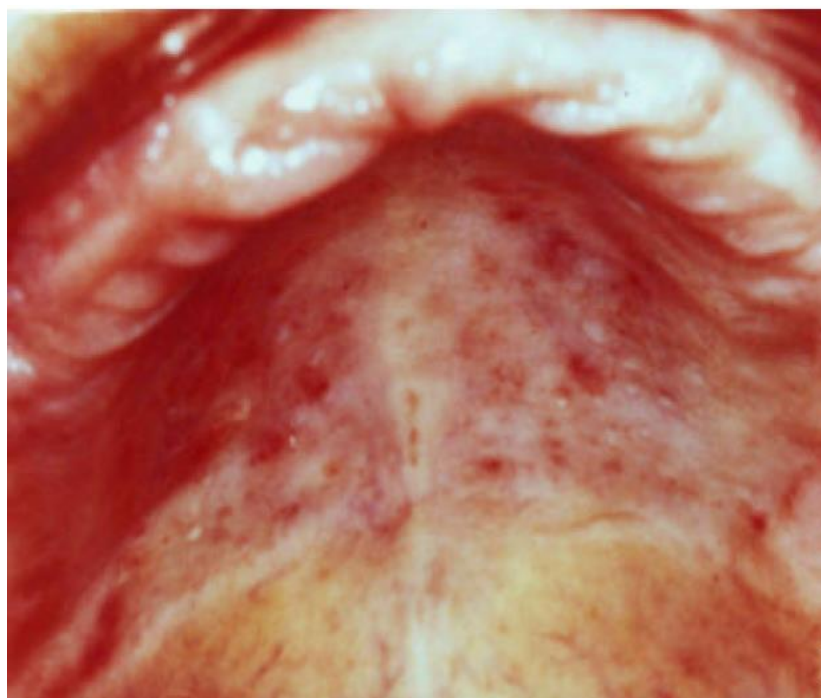


Figura 3. Aspecto clínico da estomatite protética de Classe 1 de Newton (Fonte: Lemos et al., 2003).

A prótese é o fator inicial dessa enfermidade, onde os microrganismos, em especial as espécies de *Candida*, possuem a capacidade para colonizar a superfície porosa da resina. O biofilme que se forma na superfície da prótese funciona como um depósito de microrganismos. Apesar da aparência clínica, a EP em partes é assintomática e os indivíduos portadores não sabem de sua existência. Quando há sintomatologia, as manifestações mais comuns são a sensação de queimadura ou desconforto, o relato de gosto ruim na boca, hemorragias e halitose (Ramage et al., 2005; Giannini et al., 2011).

Clinicamente, a EP pode ser classificada em três tipos (Newton, 1962):

- Tipo I: Hiperemia puntiforme (classe I) - É determinada pela hiperemia dos ductos de glândulas salivares palatinas menores o que atribui aparência eritematosa puntiforme, podendo ocupar áreas dispersas ou pequenas áreas localizadas no palato;

- Tipo II: Hiperemia difusa (classe II) - É o tipo mais frequentemente encontrado. Exibe mucosa lisa e atrófica, com aspecto eritematoso em toda a localidade sob a prótese;

- Tipo III: Hiperemia granular (classe III) - É comumente associada à câmara de sucção, emergindo à região central do palato com aspecto clínico

nodular e rugoso da mucosa (Newton, 1962). Caso esta enfermidade não seja tratada pode avançar do estágio I para o II e deste para o III.

A etiologia dessa enfermidade é considerada multifatorial tornando complexo o seu tratamento. Os fatores que contribuem para essa etiologia é a higiene bucal inadequada, diminuição do fluxo salivar, o hábito de fumar, o uso contínuo das próteses, porosidade da resina acrílica, alergia ao monômero residual e a formação do biofilme (Pereira-Cenci et al., 2008; Sesma & Morimoto, 2011; Corte-Real et al., 2011; Mima et al., 2011; Melo & Guerra, 2014).

A etiologia multifatorial da EP é explicada por diversos estudos devido principalmente a uma infecção ocasionada por *C. albicans*, considerada um dos principais microrganismos envolvidos nesta enfermidade (Dorko et al., 2001; Gendreau & Loewy, 2001; Salerno et al., 2011). *C. albicans* é designada como a espécie mais prevalente e patogênica das espécies de *Candida*, representando 70% a 80% dos isolados orais. Entretanto, pode ser ocasionada por diferentes espécies do gênero, tais como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* (Avrella & Goulart, 2008). As espécies de *Candida* atuam como patógeno oportunista quando a resistência do hospedeiro é superada pela virulência do microrganismo (Pereira-Cenci et al., 2008).

A acuidade de *C. albicans* na patogenia da EP começou a ser debatida por Budtz- Jørgensen (1974). O mesmo refere que a presença da prótese (removível, parcial ou total) na cavidade bucal é um fator principal para o desenvolvimento dessa enfermidade. A EP pode ser agravada pela infecção por fungos usualmente associada a utilização de próteses dentárias a base de resina acrílica. Mesmo que a infecção fúngica seja devidamente tratada, as recorrências são comumente encontradas e o comprometimento de outras partes da cavidade oral (língua e comissura labial) é frequentemente observado. Para o mesmo autor, nos indivíduos saudáveis, a EP não é considerada uma patologia de alta gravidade, contudo, a candidíase bucal pode evoluir para quadros de infecções sistêmicas em pacientes quando submetidos a terapias prolongadas com antibióticos, corticosteroides e imunossupressores. Os efeitos ocasionados pelas espécies de *Candida* estão diretamente ligados a

degradação da superfície epitelial da mucosa através da ação de enzimas e ação hipersensitiva tardia. As endotoxinas desenvolvidas por *Candida* spp. podem injuriar as lesões decorrentes do uso de próteses a base de resina acrílica (Budtz- Jørgensen, 1974).

Em um estudo realizado por Sanitá et al. (2011) foi avaliada a prevalência de espécies de *Candida* spp. entre portadores de próteses totais com ou sem diabetes *mellitus*. Como resultado, *C. albicans* foi o microrganismo predominante (81,9% dos pacientes estudados), seguida por *C. tropicalis* (15,71%) e *C. glabrata* (15,24%). Nessa pesquisa, uma explicação dessa interação dos microrganismos prevalentes é devido a relação sinérgica envolvida, aumentando assim o potencial patogênico dessa combinação. Por fim, o predomínio dessas espécies estudadas foi consideravelmente maior nos grupos de pacientes com EP, quando comparados ao grupo controle (pacientes saudáveis).

Uma revisão da literatura sobre a epidemiologia e etiologia da EP e a relação dos materiais para base de prótese foi realizada por Gendreau & Loewy (2011). Em seus estudos relacionados a epidemiologia, os fatores demográficos incluíram pessoas idosas que são os maiores utilizadores de próteses, bem como o sexo feminino, o tabagismo e doenças que comprometem a função imunológica. Em relação as próteses foram enfatizadas o demasiado uso na parte superior, suporte inadequado e mal higienizado dos mesmos, acentuando o trauma e a irritação da mucosa, a presença de infecção microbiana ocasionada por fungos patogênicos (principalmente por *Candida*). Além disso, as lesões crônicas sempre ocorrem no palato e estão associadas a utilização de próteses, sendo que o microrganismo que mais acomete essa enfermidade é a *C. albicans*. Entretanto, outras espécies de *Candida* vem ocasionando problemas à saúde bucal do paciente. Entre elas, destacam-se: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Os materiais utilizados nas próteses dentárias removíveis fornecem um aumento para a EP. Essa explicação se deve ao fato deste material apresentar rugosidade e hidrofobicidade superficial, promovendo assim a colonização, aderência do microrganismo e o desenvolvimento do biofilme.

Em 2015, Prakash et al. constataram que a prevalência de diversas espécies de *Candida* foi expressivamente maior em usuários de próteses, sendo as espécies mais predominantes *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliensis* e *C. glabrata*. Assim, o mesmo autor relatou que a idade foi um fator relacionado à prevalência dessa espécie.

Bianchi et al. (2016), realizou um estudo com idosos que utilizaram próteses dentárias removíveis. Como resultado, os usuários desses materiais foram 6,9 vezes mais predispostos a desenvolver candidíase oral do que idosos não portadores. O autor relata que a higienização inadequada da prótese é um fator conexo ao crescente aumento do número de *Candida* spp. Nessa pesquisa foi constatado que o microrganismo mais comumente isolado foi a *C. albicans*.

As modificações da mucosa oral são um problema comum para pacientes com prótese dentária. A incidência da estomatite dentária foi examinada em uma revisão sistemática por Gual Vaqués et al (2017). Este autor analisou 190 artigos publicados entre 2005 e 2015, e foi relatado que a estomatite dentária afetou aproximadamente 30 % dos pacientes e foi associada com uso prolongado de prótese e pouca higiene bucal.

Em um estudo realizado por Martori et al. (2017), 84 pacientes foram entrevistados e observados clinicamente em relação a qualidade do tratamento protodôntico. Para isso, foi avaliado a retenção, estabilidade, oclusão, higiene e desgaste da prótese, estado de saúde da mucosa bucal, pH salivar e a presença de leveduras orais. Das próteses analisadas, a maioria estava em um bom estado em relação a estabilidade, integridade e retenção. Entretanto, *Candida* spp. foi encontrada em 85 % sobre as próteses. O dano à base da dentadura, o consumo de açúcar freqüente (diário/semanal) e o baixo pH salivar foram associados de forma independente à colonização de *Candida*.

A presença das espécies de *Candida* em usuários de próteses é maior do que entre os não usuários. A má higienização da prótese, sendo esta um fator retentivo de biofilme, está relacionada ao desenvolvimento da EP e, portanto, é considerada uma lesão bucal repetida, de fundamental importância a ser diagnosticada e tratada para melhoria da qualidade de vida dos pacientes acometidos (Witzel et al., 2012; Altarawneh et al. 2013; Marinoski et al. 2014).

3.5 Resistencia do biofilme de *Candida* spp. aos antifúngicos

A resistência dos biofilmes de *C. albicans* aos antifúngicos clássicos é considerada multifatorial e complexa mecanicamente. Sugere-se que isso se deve em parte a três principais fatores:

- a elevação das bombas de efluxo: na literatura descreve-se a existencia de duas classes principais de bombas de efluxo que modulam a exportação de fármacos em *C. albicans*: (a) a superfamília do transportador de fita ATP (ABC) (incluindo Cdr1 e Cdr2) e (b) superfamília do transportador principal (MF) (incluindo Mdr1) (Ramage et al., 2002; Mukherjee et al., 2003; Anderson, 2005; Cowen 2008). Nas células planctônicas, estas bombas de efluxo são tipicamente reguladas em resposta a medicamentos antifúngicos. Nos biofilmes, eles são regulados positivamente nas primeiras horas de adesão e mantêm-se regulados de maneira positiva durante todo o desenvolvimento do biofilme, mesmo na ausência de um medicamento antifúngico (Nobile et al., 2012; Nobile & Johnson, 2015). Esta regulação imediata das bombas de efluxo que ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento do biofilme é um contribuinte essencial para a recalcitância precoce de biofilmes para agentes antifúngicos. Uma possibilidade é que esta resposta rápida da transcrição pode ter evoluído em resposta a moléculas inibitórias produzidas por outras espécies microbianas que estão competindo para ocupar o mesmo nicho ambiental dentro do hospedeiro. Uma melhor compreensão estrutural de como essas bombas de efluxo exportam agentes antifúngicos conhecidos durante a formação do biofilme pode tornar viável a concepção de inibidores deste transporte e, assim, tornar os biofilmes de *C. albicans* vulneráveis a medicamentos antifúngicos existentes.

- a presença da matriz extracelular: A matriz atua como uma barreira física para a penetração de fármacos e como estabilizador da arquitetura geral do biofilme (Nett et al., 2007; Nobile & Johnson, 2015). Um componente conhecido da matriz de biofilme que contribui para suas propriedades resistentes aos medicamentos é o polissacarídeo β -1,3-glucano (Nett et al., 2007). O

tratamento de biofilmes com β -1,3-glucanase aumenta a suscetibilidade de biofilmes ao fluconazol e a adição de β -1,3-glucanos exógenos aumenta a tolerância das células planctônicas ao fluconazol (Nett et al., 2007). Sugere-se que os β -1,3-glucanos da matriz podem se ligar especificamente à anfotericina B, impedindo assim que este medicamento antifúngico exerça seu efeito nas células fúngicas encapsuladas na matriz dentro de um biofilme (Vediyappan et al., 2010). Especificamente segmentar ou degradar enzimaticamente a matriz de biofilme pode revelar-se uma abordagem útil no desenvolvimento de novas terapêuticas contra biofilmes de *C. albicans*.

- existência de células recalcitrantes, metabolicamente inativas, referidas como Células "persistir": Essas células são um subconjunto secundário de células metabólicas de leveduras latentes que surgem estocasticamente como variantes fenotípicas dentro de biofilmes e são extremamente resistentes aos fármacos antifúngicos (Nett et al., 2007; Mathé & Van Dijck, 2013). Essas células foram descobertas em biofilmes de *C. albicans* após o tratamento com Anfotericina B, o qual foi observado uma morte bifásica de células (LaFleur et al., 2006; Mathé & Van Dijck, 2013). Apesar das células "persistir" não serem tão conhecidas ou se ter pouco conhecimento da formação e os papéis das mesmas durante o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, os autores sugerem que a resistência à droga das células "persistir" é independente da composição da membrana celular e da expressão da bomba de efluxo, e sim envolve o resultado do estado metabolicamente inativo das células (Nobile & Johnson 2015). Entender como células "persistir" são reguladas e controladas mecanicamente é uma área nova, o que poderia levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para bloquear sua formação ou sobrevivência.

Em um estudo realizado na Faculdade de Odontologia da Universidade do Porto, dez pacientes apresentando a EP foram tratados com fluconazol. Assim, o estudo avaliou a carga oral, o perfil de suscetibilidade ao fluconazol e a variabilidade genotípica dos isolados de *C. albicans* de pacientes com EP antes, imediatamente, após o tratamento com fluconazol e após o seguimento de 6 meses. Como resultado, o tratamento com o antifúngico

comercial curou ou melhorou a EP em 77,8% dos pacientes, acompanhada de uma redução de 83,5% na carga oral de *C. albicans*. Contudo, após o período de 6 meses, a carga oral de *C. albicans* aumentou expressivamente e a gravidade da EP foi semelhante à observada antes do tratamento. O predomínio de pacientes com cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol aumentou expressivamente ao longo do estudo: imediatamente após o tratamento com fluconazol: 10,0%; após o seguimento de 6 meses: 42,9%. Fluconazol apresentou uma boa eficiência de tratamento da EP a curto prazo, mas pode estar associado a um surgimento a longo prazo da resistência de *C. albicans* ao fluconazol (Figueiral et al., 2015).

Menciona-se que a EP possui um tratamento difícil e com recidivas (Gendreau & Loewy, 2011). Uma das razões desses problemas mencionados é devido a crescente resistência aos antifúngicos e isso tem representado um grande desafio para a saúde pública.

3.6 O tratamento convencional e novas moléculas para uso odontológico em micoses orais oportunistas

Atualmente não existem medicamentos específicos para o tratamento do biofilme em qualquer infecção microbiana, tornando o tratamento dessas infecções um problema de saúde pública. Como já mencionado anteriormente, a resistência dos biofilmes aos medicamentos antifúngicos padrão é considerada multifatorial (Gulati & Nobile, 2016). Essa preocupação se deve ao fato das células sésseis serem intrinsecamente resistentes aos fármacos devido à sua elevação de bombas de efluxo de fármacos e seus estados metabólicos alterados. Essas características específicas das células sésseis dificultam o desenvolvimento de terapias eficazes para infecções de biofilme fúngico.

O tratamento convencional para a EP envolve o uso de antifúngicos na forma sistêmica ou tópica, o uso de agentes antimicrobianos, higienização das próteses dentárias para controle do biofilme e a remoção das mesmas para dormir (Salerno et al., 2011). Em relação aos antifúngicos comerciais, utiliza-se a classe de poliênicos (nistatina e anfotericina B), os imidazóis (miconazol e o

clotrimazol), os triazóis (fluconazol e o itraconazol) (Paiva et al., 2009).

Os medicamentos para uso tópico são aplicados em diversas micoses superficiais, embora os resultados clínicos dependam de alguns fatores como o tipo de lesão e mecanismo de ação do fármaco. As formas em pomada, gel e solução são as mais indicadas para o tratamento das candidíases bucais. Um dos mais utilizados é o antifúngico tópico miconazol, que, por possuir apresentação em gel oral com adesivo, permite um maior tempo de permanência na boca, sendo aplicado 4 vezes ao dia, por 15 dias (Paiva et al., 2009). Entretanto, caso ocorra uma falha na terapêutica tópica, o tratamento a seguir é realizado com fármacos com ação sistêmica, sendo assim, o fluconazol é o antifúngico mais frequentemente prescrito pelos dentistas. A escolha deste fármaco pode ser justificada pela sua alta biodisponibilidade, baixa hepatotoxicidade, baixo custo e possibilidade de administração por via oral e intravenosa. Contudo, sabe-se que a resistência de *C. albicans* a classe dos azóis é elevado, levando a formação de microrganismos seletivos, o que favorece a manifestação de infecções de espécie por CNA.

A nistatina é referida como eficaz frente as cepas de *Candida* spp. que, muitas vezes, são resistentes ao fluconazol e anfotericina B. A nistatina é utilizada na forma de suspensão oral (100.000UI/mL), sendo administrada 3 a 4 vezes ao dia (Brunton et al., 2012).

Além dos tratamentos citados acima, o uso de enxaguantes bucais tornou-se eficaz em varias situações, que vão desde a halitose até o tratamento de infecções. Dentre os enxaguantes bucais mais encontrados no mercado, destaca-se os principios ativos, tais como a clorexidina e o cloreto de cetilpiridinio. A maioria dos enxaguantes bucais contém 5 a 25% de álcool, sendo que o mesmo é utilizado para estabilizar os principios ativos, promover uma ação refrescante, elevar o prazo de validade e, por fim, evitar a contaminação de microrganismos. Dados da literatura relatam que o uso prolongado de antissepticos bucais com constituição a base de álcool na formulação podem ocasionar uma descamação da mucosa, além de prejudicar as papilas gustativas (White, 2005).

A clorexidina é a mais utilizada e considerada “padrão ouro” no

controle do biofilme (Fardin et al., 2011). Entretanto, a utilização desse composto por mais de 14 dias pode estar associada a efeitos colaterais como manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, descamação e perda da sensibilidade e gosto amargo (Fardin et al., 2011).

O cloreto de cetilpiridínio é um surfactante catiônico monovalente, pertencente aos compostos de amônio quaternário, apresenta um amplo espectro antimicrobiano (Haps et al., 2008; Moreira et al., 2009; Shim et al., 2012). Este composto é utilizado para promover uma redução considerável do biofilme, produzindo melhorias nos pacientes com EP (Carson et al. 2009; Cavalcanti et al., 2009; Moreira et al., 2009; Wen et al., 2016). Contudo, apesar do seu uso generalizado, esse composto apresenta efeitos adversos, tais como; manchas nos dentes, síndrome da boca ardente, ulceração recorrente e aumento da formação de cálculos, especialmente quando usado por um longo período de tempo (Moreira et al. 2009; Thomas 2011). Logo, ressalta-se a necessidade da prospecção de novos agentes eficazes no controle do biofilme fúngico nas próteses dentárias.

Outros enxaguantes bucais distribuídos no mercado que possuem atividade antimicrobiana são os que possuem em sua constituição óleos essenciais, tais como mentol, timol, eucaliptol e salicilato de metila. Essa atividade lhe é atribuída devido a presença de compostos fenólicos como seus principais constituintes (Bugno et al., 2006). De acordo com a Associação dos Higienistas Dentais do Canadá, a associação desses compostos concomitantemente demonstraram uma redução da placa microbiana (Asadoorian, 2006). Entretanto, devido a presença do álcool em sua constituição, o efeito adverso devidamente encontrado é a sensação de queimação e ardência na boca.

Alternativas que vem sendo estudadas para a melhoria das próteses dentárias com atividade antimicrobiana é a incorporação da resina acrílica com biocidas, tais como nanopartículas (dióxido de nanotitânio ou dióxido de nanosilicônio), clorexidina ou compostos orgânicos (metacrilato de 2-terc-butilaminoetilo, fosfato de metacrilato de etilenoglicol), sais quaternário de amônio (brometo de metacrilato de undecil piridínio) e nanopartículas de

polietileno imina de amônio quaternário. Contudo, a liberação de substâncias tóxicas pode afetar a mucosa oral, o que pode ocasionar resistência microbiana, e o antimicrobiano pode perder eficácia ao longo do tempo (Puri et al., 2008; De Prijck et al., 2010; Paleari et al., 2010; Regis et al., 2011; Song et al., 2011; Monteiro et al., 2012; Bertolini et al., 2014; Compagnoni et al., 2014; Bueno et al., 2015; PietroKovski et al., 2016).

Outra alternativa que vem sendo estudada na literatura e sendo efetiva *in vitro* e *in vivo* contra bactérias e fungos, incluindo cepas resistentes aos fármacos é a terapia fotodinâmica (Dovigo et al., 2011; Pereira et al., 2011; Gonzales & Maisch, 2012; Martins et al., 2011). Esta terapia utiliza fotossensibilizadores (exógenos ou endógenos), e a morte do microrganismo ocorre quando o fotossensibilizador absorve a energia da fonte luminosa. Não há relatos sobre o desenvolvimento de resistência à essa terapia (Tavares et al., 2010).

Outros autores sugerem que a utilização de adesivos para as próteses dentárias foi considerada um complemento necessário para a retenção e estabilidade da prótese dentaria. O termo “adesivo para prótese dentária” refere-se a um material solúvel não tóxico comercialmente disponível, aplicado à superfície da dentadura que tem como objetivo melhorar a retenção, estabilidade e função da prótese. Papadiochou et al. (2015) revisaram dados da literatura em relação à eficácia e biocompatibilidade dos adesivos dentários, bem como o comportamento dos pacientes e dos profissionais dentários em relação a esses materiais. Como resultado, a maioria dos estudos clínicos apoiou o fato de que os adesivos para próteses dentárias melhoram retenção, estabilidade e desempenho mastigatório de uma prótese removível. Entretanto, em termos de biocompatibilidade, existem poucos estudos *in vivo* para investigar potenciais efeitos nocivos dos adesivos para proteses dentarias.

Em um estudo realizado por Cierech et al. (2016) para tratar e prevenir a EP foram testados compostos de polimetacrilato dopados com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) (concentrações de peso, 2,5%, 5%, 7,5%) e essa mesma associação com nanopartículas de óxido de zinco solvotérmicos e hidrotérmicos pulverizados. As investigações realizadas nos biomateriais foram

avaliar a influência na solução de *C. albicans*, coloração de biofilmes, análise de XTT ((2,3-Bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazolium-5-carboxanilida)) e análise quantitativa de *C. albicans* aderidos. Como resultado, foi evidenciado a atividade antifúngica tanto dos nanocompositos quanto da eficácia da pulverização catódica de nanopartículas de óxido de zinco no polimetacrilato. O estudo da deposição de biofilme na superfície mostrou que as propriedades antifúngicas aumentam com o aumento da concentração de ZnO-NPs. O ensaio XTT, em conjunto com o teste da turbidez das soluções, pode indicar o mecanismo pelo qual os ZnO-NP exercem seu efeito no aumento da indução de estresse antioxidante em células de microrganismos.

Pinto et al. (2008) utilizaram em seus experimentos o uso do vinagre para controlar a infecção ocasionada por *Candida* spp. em indivíduos que utilizavam próteses dentárias. Nesse ensaio participaram 55 indivíduos usuários de próteses totais e os mesmos foram instruídos a retirar a prótese durante a noite por um período de 8 horas. Além disso, os indivíduos foram orientados a escovar a dentadura três vezes ao dia (por um minuto) e a deixar a resina imersa durante a noite em uma solução contendo 10% de vinagre. Após 45 dias desses procedimentos, concluíram que a imersão da prótese durante a noite nessa solução foi capaz de diminuir a presença de *Candida* spp. na saliva dos indivíduos, bem como reduziu o episódio de EP na população analisada.

Uludamar et al. (2011) avaliaram três formulações para o tratamento da EP. O primeiro grupo recebeu a formulação Visco-gel, utilizada como reembasamento da prótese. O segundo grupo recebeu como tratamento o enxaguante bucal Dioxident[®] (com o princípio ativo dióxido de cloro), durante o tempo de um minuto. O terceiro grupo também utilizou um enxaguante bucal, entretanto, o princípio ativo foi o gluconato de clorexidina a 0,2%. Como resultado, o primeiro grupo não foi capaz de reduzir a contagem de colônias de *C. albicans*, entretanto reduziu a inflamação do palato. Os demais grupos de enxaguantes bucais foram expressivamente eficazes em reduzir a contagem de *C. albicans* e melhorar o grau de inflamação do palato.

Cochis et al. (2012) avaliou *in vitro* a atividade preventiva de anti aderência de biossurfactantes frente ao biofilme de *C. albicans*. Os

biossurfactantes são moléculas biológicas isoladas de microrganismos produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular por vários organismos, tais como bactérias e fungos. A estrutura contém um componente não-polar hidrofóbico que consiste em ácidos insaturados, saturados ou gordurosos, enquanto que o componente hidrofílico é composto de aminoácidos, carboidratos, fosfatos ou péptidos cíclicos. Neste estudo, discos a base de silício e resina acrílica para próteses dentárias foram pré-revestidos com concentrações de biossurfactantes obtidos a partir de biofilmes de endófitos selecionados de *Robinia pseudoacacia* e de *Nerium oleander*, e depois infectadas com *C. albicans*. Como conclusão deste estudo, a atividade preventiva de anti aderência dos biossurfactantes frente ao biofilme de *C. albicans* foi evidenciado, no qual esses tensoativos interferem na adesão microbiana e demonstraram não serem citotóxicos em células epiteliais e fibroblastos.

Salim et al. (2013) utilizaram métodos para alterar as características químicas dos biomateriais, já que os mesmos oferecem uma solução atrativa para o controle microbiano aprimorado. O objetivo destes autores foi investigar *in vitro* a eficácia de um modelo acrílico de poli (etil metacrilato)/metacrilato de tetrahidrofurfurilo impregnado com fluconazol ou clorexidina com intuito da prevenção da formação de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028. Os discos foram incubados por 2, 7, 14, 21 ou 28 dias a 37 ° C e a biomassa do biofilme e a atividade metabólica foram quantificadas em cada ponto do tempo usando coloração cristal violeta e XTT. Os discos de fluconazol apresentaram poucas características inibitórias de biofilme, com inibição metabólica e biomassa média de 12,6% e 8,8%, respectivamente. Quando o fluconazol foi comparado a clorexidina, as mesmas foram altamente eficazes, inibindo significativamente o desenvolvimento do biofilme em 75% e seu metabolismo em 84% em todos os tempos testados. Os autores concluíram que a eficácia apresentada pela clorexidina frente ao biofilme de *C. albicans* é um resultado promissor para superar os efeitos colaterais e a fraca atividade relativa de agentes antifúngicos convencionais contra os biofilmes de *Candida*.

Novas formulações dos fármacos disponíveis ainda são necessárias

para o tratamento das doenças bucais, assim como a pesquisa de novos sistemas de tratamento para a EP (Sankar *et al.*, 2011). Diversos materiais estão sendo estudados com o intuito de evitar o desenvolvimento de biofilme na prótese dentária (Gendreau & Loewy, 2011). Agentes antimicrobianos tem sido incorporados em resinas acrílicas condicionadoras de tecidos e em resinas reembasadoras para a base de prótese, dentre eles destacam-se: nistatina, fluconazol, itraconazol, clorexidina, triclosan, zeólito de prata, zeólito de zinco. Apesar de grandes inovações nessa área, observa-se que há dificuldade de manter o agente antimicrobiano nesses materiais por um tempo prolongado (Salim *et al.*, 2013).

Baseado em todos os estudos citados acima, é possível notar que apesar de diversas técnicas que vem sendo abordadas, ainda não há um tratamento eficaz para os usuários de próteses dentárias, onde o agente antimicrobiano possa atuar de forma satisfatória nos microrganismos causadores da EP, evitando assim, a colonização, proliferação e desenvolvimento do biofilme fúngico.

3.6.1 Sais imidazólicos e Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são substâncias líquidas a temperaturas menores que 100 °C, que possuem estruturas cristalinas iônicas-covalentes e são amplamente conhecidos por apresentar características importantes. Dentre elas destacam-se: volatilidade insignificante, não são inflamáveis, ampla estabilidade térmica e química, boa condutividade elétrica e capacidade de dissolver materiais orgânicos e inorgânicos (Dupont *et al.*, 2000; Migowski & Dupont, 2007).

Os LIs fazem parte da classe dos sais imidazólicos, que são todas as substâncias formadas por cátions e ânions tendo em sua constituição uma unidade imidazólica. Os sais imidazólicos são utilizados em várias aplicações farmacêuticas e químicas por apresentar propriedades físicas e químicas que toleram alterações estruturais (tanto no cátion como o anión) ou através da incorporação de um grupo funcional específicos nos íons constituintes (Figura 4)

(Riduan & Zhang, 2013; Pendleton & Gilmore, 2015).

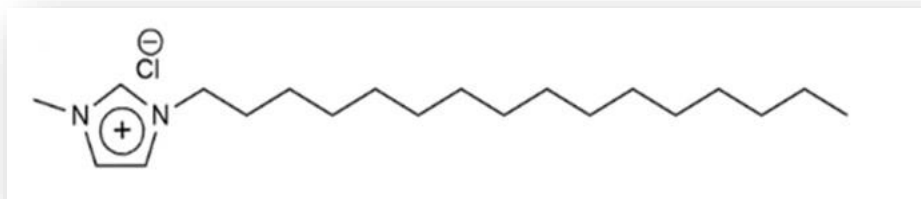


Figura 4. Estrutura química de um sal imidazólico (Cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico)

Diversas atividades biológicas têm sido designadas a este grupo, tais como, antitumor, antioxidante, antifibrosa, bioengenharia, antimicrobiana, entre outras (Riduan & Zhang, 2013; Pendleton & Gilmore, 2015; Smiglak et al., 2014). Entre elas destaca-se a atividade antifúngica que vem sendo apresentada pelos sais imidazólicos.

Em 2013, o nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade antifúngica de 14 compostos LI imidazólicos através do teste de suscetibilidade *in vitro* frente a cepas de leveduras emergentes. Neste trabalho foram utilizados os seguintes sais imidazólicos: sais metilimidazólicos *N*-substituídos, incluindo os *N*-substituintes-(CH₂)_nCH₃ (n= 3, 5, 9, 13, 15); -(CH₂CH₂O)_nCH₃ (n = 1, 3); -(CH₂)_nCO₂H (n = 1, 3) e os aniões cloreto (Cl⁻), tetrafluorborato (BF₄⁻), bis(trifluorometanosulfonil)imida (F₃CSO₂)₂N⁻, metanossulfonato H₃CSO₃⁻ e hexafluorofosfato (PF₆⁻). Como resultado, os sais imidazólicos com *N*-alquil-substituídos (n = 9, 13, ou 15), apresentaram atividade antifúngica em concentrações extremamente reduzida frente as cepas de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *Trichosporon asahii*. Interessantemente, o composto C₁₆MIImCl foi o composto que apresentou a melhor atividade antifúngica e todos os compostos testados não foram citotóxicos e genotóxicos em leucócitos humanos (Schrekker et al., 2013).

A utilização de compostos com ação eletrostática sobre a parede e a membrana celular são essenciais para a atividade antimicrobiana dos compostos. Assim, através dos estudos publicados por Schrekker et al. (2013) o

mecanismo proposto para os sais imidazólicos é fundamentado a partir da permeabilidade da membrana celular fúngica devido a propriedade anfifílica conferida pelas cadeias alquílicas. Além disso, outro mecanismo proposto seria a inibição do sistema enzimático citocromo P450.

A unidade imidazólica é encontrada em uma gama de substâncias biologicamente ativas, em antifúngicos tais como econazol, fenticonazol, isoconazol, cetoconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, bifonazol, butoconazol, clotrimazol, sulconazol e tioconazol. Além disso, outros fármacos antifúngicos relacionados são os triazóis: fluconazol, albaconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol; tiazóis: abafungin. Como mecanismo de ação, essas classes inibem a enzima lanosterol 14- α demetilase, enzima importante para conversão do lanosterol a ergosterol (Kanafani & Perfect, 2008).

Estudos realizados por Bergamo et al (2015a) avaliaram a atividade *in vitro* do composto C₁₆MImCl frente as células planctônicas e de biofilme de *C. tropicalis* resistentes a múltiplos fármacos, ambos em solução e aplicados em uma superfície de cateter traqueal. Em ambos os casos, o C₁₆MImCl foi capaz de impedir a formação do biofilme fúngico em concentrações extremamente baixas. Esse foi o primeiro estudo realizado abordando a propriedade de bloqueio antifúngico desse composto, utilizando um cateter traqueal e mimetizando uma condição clínica.

Bergamo et al. (2015b) verificaram o potencial do 1-n-hexadecil-3-metilimidazol metanossulfonato (C₁₆MImMeS) e sais de cloreto (C₁₆MImCl) para avaliar a erradicação do biofilme fúngico de *C. tropicalis*, comparando com o desempenho de fármacos clorexidina e fluconazol. A concentração obtida para os compostos testes foi obtida através da exibição ao biofilme fúngico em diferentes concentrações. Assim, foi considerado um resultado expressivo as concentrações desses compostos que obtiveram 80% da atividade efetiva contra as células viáveis de biofilme. Como resultado, C₁₆MImMeS e C₁₆MImCl foram capazes de erradicar o biofilme em concentrações menores (15,6 e 0,45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) que a clorexidina (1250 $\mu\text{g/mL}$). Interessantemente, o fluconazol apresentou os resultados mais inferiores, no qual as células viáveis

de biofilme foram resistentes ao antifúngico comercial.

Dalla Lana et al. (2015) avaliou a ação antidermatofítica dos sais imidazólicos, no qual foi determinado a relação estrutura-atividade e caracterização do perfil toxicológico dos compostos. Em seus estudos, foi demonstrado pela primeira vez o efeito potencial antifúngico dos sais imidazólicos (em especial o C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS) contra dermatófitos multirresistentes, sem apresentar toxicidade para as células leucocitárias humanas.

Diante dos dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa, os sais imidazólicos, em especial o composto C₁₆MImCl, poderiam vir a cooperar para uma promissora atividade antifúngica e antibiofilme, já que os fármacos comerciais apresentam efeitos secundários indesejáveis e são, muitas vezes, indevidos principalmente contra as leveduras patógenas.

3.6.2 Selenocianatos alílicos

Derivados alílicos de (Z)-2-(bromometil)alcenoatos, reagentes oriundos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (Basavaiah et al., 2010, Ferreira et al., 2009), têm exibido significativa atividade biológica como agentes antitumorais e antimicrobianos (Cisilotto et al., 2015; Sá et al., 2014). Reservada atenção vem sendo dada aos derivados alílicos sulfurados, incluindo tiocianatos alílicos com atividade antimicobacteriana (Silveira et al., 2012), os quais são preparados a partir da reação entre (Z)-2-(bromometil)alcenoatos e NaSCN como nucleófilo (Sá et al., 2014).

De maneira correspondente aos compostos derivados de enxofre, diversos análogos contendo selênio vêm sendo estudados devido às suas propriedades biológicas (Nogueira et al., 2004). A literatura especializada descreve a síntese de selenocianatos alílicos não substituídos ou com substituintes alquila a partir de cianoselenação eletrofílica de silanos alílicos com KSeCN.2CuBr₂ (Guram et al., 1993) ou ainda a utilização de selenocianato como nucleófilo frente a halogenetos de alila (Riague et al., 2002).

A preparação de selenocianatos alílicos derivados de (Z)-2-(bromometil)alcenoatos (Figura 5) ainda não foi descrita na literatura. Da mesma forma, resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram que

os selenocianatos alílicos, o isómero selênio dos tiocianatos alílicos, apresentam altas propriedades antifúngicas frente a diversas espécies de *Candida*, dermatófitos e *Fusarium* (Silveira et al., 2017; Batista et al., 2017), com baixa pontuação irritante pelo teste *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane* HET-CAM (ICCVMA, 2010).

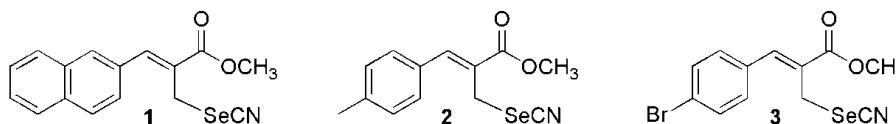


Figura 5. Estrutura dos selenocianatos alílicos

3.7 Biomateriais com atividade anti-*Candida*

O uso de dispositivos médicos tem aumentado significativamente e os mesmos se tornaram efetivos componentes para os cuidados da saúde moderna. Implantes artificiais de quadril e joelho, stents, válvulas cardíacas são extensivamente empregados para salvar vidas e restaurar a função e qualidade dos pacientes. Além disso, existem dispositivos médicos de uso não-implantado, tais como cateteres, parafusos de fixação ortopédica, lentes de contato que são utilizados por um período de tempo menor. As necessidades clínicas dos pacientes deram origem a indústria de dispositivos biomédicos e conseqüentemente uma larga pesquisa em ciências dos biomateriais (Giles et al., 2017).

Apesar do aumento da utilização de dispositivos, de materiais aprimorados e práticas cirúrgicas superarem vários desafios, outros problemas ainda permanecem na prática clínica, incluindo as infecções associadas a dispositivos. Os microrganismos são capazes de colonizar superfícies de diversos materiais sintéticos utilizados na fabricação de dispositivos médicos. Além disso, os microrganismos são capazes de crescer e formar biofilmes infecciosos em materiais como metais, cerâmicas, polímeros e lentes de contato de hidrogel de silicone. Conforme já mencionamos, as células sésseis produzem

uma matriz extracelular de polissacarídeos que podem protegê-los contra a ação de antimicrobianos. As células sésseis em dispositivos biomédicos são consideradas muito difíceis de tratar quando comparadas aos microrganismos circulantes, muitas vezes resultando na necessidade de revisão cirúrgica de uma proporção substancial de implantes infectados (Giles et al., 2017). As leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são os principais agentes causadores de infecções por biomateriais fúngicos e podem se disseminar como sepsis de sangue fúngica (candidemia). Essa colonização gera a formação de contaminação por fungos e ameaça seriamente a saúde humana ocasionando grandes perdas econômicas (Pranantyo et al., 2016). Portanto, um método eficaz contra esses microrganismos é altamente desejado.

Os polímeros são considerados uma das classes mais importantes de materiais disponíveis para várias aplicações na área farmacêutica. Existem diversos tipos de polímeros, tais como: polímeros naturais, naturais modificados e sintéticos. Esses compostos são utilizados como excipientes para formulações de cosméticos e medicamentos de liberação convencional e de liberação modificada. Recentemente, essa classe de materiais são empregadas para atuarem como moduladores e direcionadores da liberação de fármacos no organismo. Os polímeros que vem sendo estudados e utilizados são os polímeros biodegradáveis, bioadesivos, biomiméticos e hidrogéis (Villanova & Oréfice, 2010).

Resumidamente, um polímero biodegradável é definido como aquele que sofre degradação macromolecular (por microrganismos, por exemplo) e é representado pelo ácido polilático (PLA), o poli(caprolactona) (PCL) e os copolímeros dos ácidos lático e glicólico (PLGA). Os biopolímeros não biodegradáveis, tais como o polietileno-coacetato de vinila (PEVA), o álcool polivinílico (PVA), derivados da celulose, o silicone e polímeros acrílicos apresentam como principal desvantagem a necessidade de remoção posterior. Os polímeros bioadesivos são materiais apropriados a se ligarem a mucosa (mucoadesivo) ou a membrana celular e são utilizados com o intuito de aumentar o tempo de permanência de um medicamento ou o dispositivo no organismo. Além disso, a biodisponibilidade dos fármacos se torna melhor, diminuindo a

toxicidade e aumentando a efetividade terapêutica dos fármacos e dos dispositivos (Villanova & Oréfice, 2010). Esses polímeros mucoadesivos são representados pelo ácido poliacrílico (PAA) e a quitosana. Outros são: poli(óxido de etileno) (PEO), polietileno glicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), ésteres de poliglicerol de ácidos graxos (PEGF), poli(lisina), carbômeros, alginato de sódio, goma carragena, sulfato de condroitina, pectina e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Os polímeros biomiméticos são considerados como os que podem interagir com o microambiente biológico, mimetizando-o. Existem também os polímeros terapêuticos, pois os mesmos são capazes de aferir propriedades terapêuticas. Os polímeros contendo fármacos como aditivos são conhecidos como terapêuticos (Villanova & Oréfice, 2010). Os hidrogéis são polímeros formados por redes macromoleculares de natureza hidrofílica. Devido a essa característica hidrofílica, flexibilidade adequada tornam este polímero bom candidato para a medicina (Sood et al., 2014).

Diversos dispositivos médicos incorporados com fármacos vêm sendo utilizado na área farmacêutica. Exemplo desse uso são nos implantes ortopédicos, sistemas implantáveis, cateteres urinários, cateteres venosos centrais, medicamentos antimicrobianos, anti-inflamatórios e antineoplásicos (Villanova & Oréfice, 2010). De forma geral, existem diversos sistemas de dispositivos médicos nas quais os polímeros são encontrados, entre eles destacam-se (Villanova & Oréfice, 2010):

- Sistemas implantáveis: o implante é inserido de forma invasiva, em tecidos ou órgãos, sendo constituído principalmente pelos polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis.

- Sistemas na forma de adesivos: visando a ação sistêmica, o sistema na forma de adesivo é aplicado sobre a pele contendo fármaco e os principais polímeros empregados nesse sistema são o PEG reticulado, polímeros híbridos baseados em PVP e etilcelulose.

- Sistema de Desempenho Terapêutico Avançado: os carreadores micromiméticos e manométricos são capazes de articularem a liberação dos fármacos e os mesmos são utilizados em casos em que os fármacos são rejeitados devido a solubilidade e biodisponibilidade. Um polímero utilizado

nesse sistema é o PLGA.

Tratando-se dos sistemas de Desempenho Terapêutico Avançado, as nanopartículas poliméricas, nanocapsulas, nanoesferas vem se tornando propicias principalmente em aplicações de antifúngicos. Dentre os principais polímeros que vem sendo utilizados como nanocarreadores são os naturais modificados, derivados da albumina, colágeno, ácido hialurônico, gelatina, alginato, os polímeros sintéticos, PVA, a poli(acrilamida), e, por fim, os poliméricos biodegradáveis, tais como o PLA, ácido poliglicólico (PGA), PLGA, poli(caprolactona) (PCL) e poli(ortoésteres) (Salwiczek et al., 2014).

Um dos tipos de nanomateriais biocidas que vem sendo estudados na literatura é o grafeno e seus derivados (Zhang et al., 2012; Shi et al., 2015; Hegab et al., 2016; Lukowiak et al., 2016; Szunerits & Boukherroub, 2016; Zou et al., 2016; Zhu et al., 2017). Eles são fortemente estudados como materiais antimicrobianos à base de carbono com muitas aplicações potenciais, tais como: o uso no campo de medicina, energia e meio ambiente (Hegab et al., 2016; Chen et al., 2016).

Li et al. (2017) avaliou o grafeno-borneol com a possível atividade antifúngica. Foi constatado uma atividade antifúngica deste composto quando comparado ao seu controle. Além disso, após cinco dias foi verificado o mesmo efeito antifúngico deste composto em estudo. Os autores sugerem que essa atividade obtida pelo composto se deve aos grupos carboxílicos presentes na molécula, o que tornou uma compreensão aprofundada da interação fungo versus materiais a base de grafeno.

Santagata et al. (2017) avaliaram as propriedades antifúngicas de um filme bioplástico inovador e ecológico, baseado em poli(butilenosuccinato) e cavoxina (um metabólito fitopatogênico da chalcona, isolado de fungos *Phoma cava*). Através dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), os biopolímeros foram efetivos frente aos isolados encontrados em alimentos (*Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger*). Para explicar a presença da interação física entre os compostos da mistura, foi visto pela espectroscopia infravermelha que a presença dos grupos polares promoveram a atividade antifúngica. Pela cromatografia de permeação de gel foi destacado o efeito hidrolítico da cavoxina

em poli(butilenosuccinato), responsável pela difusão e liberação da biomolécula da matriz (Sangata et al., 2017).

Choi et al. (2017) avaliaram a atividade antifúngica do cloridrato de polihexametileno guanidina (polímero catiônico contendo um grupo amino e um grupo polimérico de guanidina) frente a vários fungos patogênicos de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *Malassezia furfur* (KCTC 7744), *Trichosporon beigeli* (KCTC 7707), e *Trichophyton rubrum* (KCTC 6345). Esse composto apresentou atividade antifúngica mais potente do que a anfotericina B.

Dananjaya et al. (2017) avaliaram a atividade antifúngica e a citotoxicidade de nanocompósitos de óxido de zinco-quitosana frente as cepas de *C. albicans* e células epiteliais humanas tipo 2, respectivamente. Através dos ensaios realizados de difração de raios-x, foi observado picos de difração característicos correspondentes ao óxido de zinco e a quitosana. Como resultado da atividade antifúngica, a CIM obtida para óxido de zinco em nanopartículas foi de 200 µg/mL, enquanto que para o nanocompósito o valor foi menor (75 µg/mL). Os nanocompósitos em associação com o óxido de zinco-quitosana apresentaram menor citotoxicidade com células humanas indicando a boa citocompatibilidade. Os autores sugeriram que o óxido de zinco e a quitosana tornem-se um potencial de efeitos sinérgicos para aplicações antimicrobianas e biomédicas.

Tanto células planctônicas quanto as de biofilmes fúngicos podem colonizar e desenvolver-se em uma grande variedade de dispositivos implantáveis e, por implicação, biomateriais, incluindo lentes de contato, implantes prostéticos, próteses dentárias e implantes cocleares. Recentemente, um estudo *in vitro* avaliou a formação de biofilmes de cinco diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) em três materiais clinicamente significativos: cloreto de polivinila (PVC), Teflon™ e poliuretano. Como resultado, verificou-se que todas as espécies de *Candida* formaram biofilme no Teflon™, exceto *C. glabrata*, que apresentaram maior formação de biofilme em PVC (Estivill et al., 2011). Nesse contexto, é preciso considerar tanto as espécies colonizadoras quanto das propriedades do material.

3.8 Reativação de antifúngicos com polímeros biocompatíveis

A Organização Mundial da Saúde relata de forma explícita que a resistência microbiana tem limitado a ação dos antimicrobianos e até mesmo a falta de opção do mesmo no tratamento das infecções. Para a melhoria da resistência antimicrobiana, seria necessário a melhoria dos atuais testes de diagnóstico e antimicrobianos, o incentivo para a participação da indústria farmacêutica, eliminando assim, o engarrafamento regulatório da descoberta de fármacos para a prática.

Tratando-se da resistência dos microrganismos aos antifúngicos, a situação não é diferente, especialmente devido à importância das infecções fúngicas associadas aos cuidados intensivos. A situação é agravada devido à falta de medicamentos disponíveis, onde de 2000 a 2015, apenas 5 medicamentos foram divulgados, nomeadamente Caspofungina (2001), Micafungina (2005), Posaconazol (2006), Anidulafungina (2006) e Isavuconazol (2015) (Miceli & Kauffman, 2015; Campoy e Adrio 2017).

Recentemente, medicamentos que foram desenvolvidos para uma certa desordem e reposicioná-los ou reativá-los para abordar outra enfermidade ou doença é um assunto que vem tomando certa proporcionalidade tanto para a pesquisa quanto para a indústria farmacêutica (Nosengo, 2014). Como exemplo disso, cita-se o sildenafil, uma medicação que foi desenvolvida contra a angina em 1989 e que, nos dias atuais, é comercializada como Viagra® para tratar a disfunção erétil. Outro medicamento é azidotimidina, que falhou como fármaco de quimioterapia, mas eficaz para o tratamento do HIV (Nosengo, 2014). Desde 2011, conforme American Chemical Society (2011), em torno de 30 artigos mensais sobre casos de reposicionamento de fármacos vem sendo publicados em revistas científicas, um aumento considerado quando comparado aos anos anteriores. No entanto, no caso dos antifúngicos, uma reattribution não é frequentemente observada, especialmente devido aos seus mecanismos de ação habituais (Wiederhold, 2017; Fuentesfria et al., 2018), assim, são necessárias diferentes soluções.

Estratégias como associações de medicamentos ou de produtos

naturais não são novas (Bennet & Kim, 2014), onde muitas vezes estas associações são compostas por pequenas moléculas. Ao mesmo tempo, muitos sistemas poliméricos de encapsulamento de fármacos são utilizados na administração de fármacos, como uma maneira de melhorar, controlar a sua entrega, liberação e/ou reduzir a toxicidade do medicamento (Bennet & Kim, 2014). Para o último, a droga de escolha é sempre uma potente e conhecida por ser muito ativa para a enfermidade alvo (Bennet e Kim 2014). No entanto, pouco se sabe sobre o quanto o polímero envolvido pode influenciar a atividade antifúngica, especialmente quando se usa um medicamento que o microrganismo alvo já desenvolveu um mecanismo de resistência. Uma característica comum dos polímeros utilizados nessas abordagens é a sua biocompatibilidade/baixa toxicidade para células de mamíferos (Bennet & Kim 2014).

Os polímeros solúveis em água, tais como o PVOH e PDDA são opções interessantes para aplicações biológicas devido à sua baixa toxicidade processual intrínseca, evitando resíduos solventes-orgânicos no processo e biocompatibilidade usual (Alatorre-Meda et al., 2010).

Um novo polímero biodegradável baseado em álcool polivinílico modificado foi patenteado e o seu nome é comercialmente conhecido como G-polymer (Figura 6). Esse polímero neutro é particularmente interessante por possuir características importantes, tais como: facilidade em formar revestimentos e perfeitas propriedades de barreira ao gás oxigênio. Devido a essas características, este polímero possui aplicações em embalagens para alimentos ou medicamentos (Yan et al., 2015) (Figura 6).

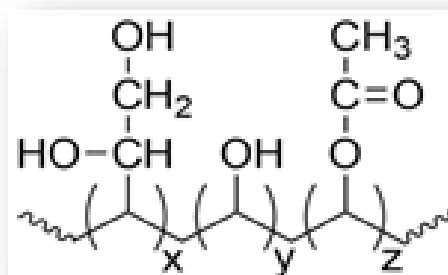


Figura 6. Estrutura química do álcool polivinílico modificado (PVOH)

Policátions solúveis em água foram descritos para diversas aplicações técnicas e biomédicas. O polímero PDDA tem sido considerado seguro para a saúde humana e é amplamente utilizado para tratamento de águas residuais, separação de óleo-emulsões de água e também como auxiliar de retenção iônica. Na área biomédica, estudos relatam a investigação como micro e sistemas portadores de fármacos nanoparticulados para proteínas e peptídeos (Lu et al., 2008), bem como sistemas vetoriais não virais (Alatorre-Meda et al., 2010) (Figura 7).

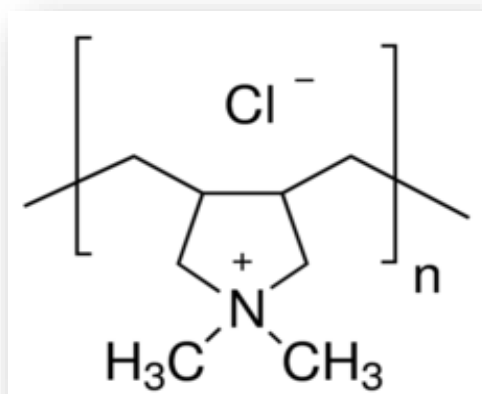


Figura 7. Estrutura química do cloreto de poli(dialildimetilamônio)

Diante da falta de dados para a atividade contra fungos, é relatado pela primeira vez o uso de fármacos ativos antimicrobianos associados a polímeros biocompatíveis, como uma abordagem alternativa e versátil contra espécies patogênicas de *Candida*. Deste modo, reduzindo a concentração efetiva do fármaco antifúngico, mantendo o mesmo efeito, com atividade antifúngica superior ao do antifungico original.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras utilizadas para o estudo dos enxaguantes bucais

4.1.1 Cepas

Cepas de *C. tropicalis* (72A, 72P, 57A), *C. glabrata* (RL22, RL24, RL25), *C. parapsilosis* (RL32, RL11, RL20), depositado na biblioteca do Laboratório de Micologia Aplicada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS - Brasil), e uma cepa comercial de *C. albicans* (ATCC18804) foram utilizadas neste estudo. Todas as cepas foram identificadas fenotipicamente mediante do sistema automatizado *Vitek Yeast Biochemical Card* (BioMerieuxVitek,. Hazelwood, Mo.). As cepas foram acondicionadas em geladeira e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA; Himedia).

4.1.2 Preparo dos compostos C₁₆MImCl e selenocianatos alílicos

O sal imidazólico C₁₆MImCl (Figura 4) foi sintetizado conforme Schrekker et al. (2008), com pureza final >98%, provenientes do Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise (TECNOCAT), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O C₁₆MImCl foi dissolvido em água destilada estéril e a solução-estoque foi preparada em uma concentração de 500 µg/mL.

A síntese dos selenocianatos alílicos (Figura 5) foram preparados combinando o selenocianato de potássio nucleofílico (KSeCN) com o brometo de alila eletrofílico, um precursor versátil prontamente preparado através do tratamento de adutos Morita-Baylis-Hillman (Basavaiah & Reddy, 2010) com LiBr em meio ácido (Ferreira et al., 2009). Os compostos **1-3** (obtidos em rendimentos químicos de 82-90%) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar soluções-estoque de 10 mg/mL. Em seguida, foram subsequentemente diluídos para 150 µg/mL na solução de formulação de enxaguante bucal de modo

que a concentração final de DMSO fosse 1,5%.

4.2 Teste de Suscetibilidade do C₁₆MImCl frente as células planctônicas

Foi realizado o teste de suscetibilidade do composto C₁₆MImCl para avaliar a sensibilidade ou resistência para todas as cepas planctônicas. O ensaio foi realizado conforme a técnica da microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

4.2.1 Preparação do inóculo

As cepas foram cultivadas em Agar Sabouraud (AS) com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, India) e incubados a 35 °C por 24 h. Suspensão de células foram preparadas em solução salina 0,9 % estéril na concentração de 0,5 na escala McFarland (1×10^6 a 5×10^6 cels/mL). A partir desta solução fúngica, diluição 1:50 em salina estéril foi aplicada seguida de uma diluição 1:20 em caldo RPMI 1640 sem bicarbonato de sódio (RPMI; Gibco) tamponado com *morpholinepropansulfonic acid* (MOPS; Sigma) e ajustado para pH 7,0, resultando em uma concentração de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ cels/mL.

4.2.2 Microdiluição em caldo

O teste de suscetibilidade foi realizado em microplacas de poliestireno, descartáveis, com 96 poços. Primeiramente, pipetou-se 100 µL de solução RPMI na microplaca, sendo: controle positivo (100 µL) e no controle negativo (200 µL). Posteriormente, C₁₆MImCl, duas vezes mais concentradas, foram depositadas na primeira coluna e microdiluições seriadas foram realizadas totalizando 100 µL de dez concentrações teste para o composto em estudo. Por fim, adicionou-se o inóculo fúngico (100 µL) na microplaca. O teste foi realizado em triplicata e as microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 h. A leitura foi realizada de forma visual, observando o crescimento ou não dos aglomerados

de células fúngicas no fundo da cavidade da placa. O intervalo de concentração testado para a posterior atividade antibiofilme do C₁₆MImCl foi de 0,47 a 250 µg/mL, com base nos valores de CIM obtidos.

4.3 Ensaio de formação do biofilme em microplacas de 96 poços

A identificação da formação de biofilme foi realizada utilizando uma microplaca de 96 poços conforme descrito por Bergamo et al. (2015a) e Stepanovic et al. (2007), com modificações. As cepas de fungos foram cultivadas em agar Sabouraud durante 24 h a 35 °C. Alíquotas de 20 µL de cada solução fúngica contendo 10⁶ Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) foram transferidas para microplacas e suplementados com 180 µL de caldo de triptose de soja (TSB; Sigma-Aldrich). Após incubação durante 48 h, a 35 °C, foi adicionada água destilada estéril a cada poço para remover as células não aderentes. Em seguida, 150 µL de metanol foram vertidos em cada poço e o solvente removido. As microplacas foram coradas durante 15 minutos com 150 µL de solução cristal violeta a 0,5% (Newprov), à temperatura ambiente, e depois limpas com água. O biofilme adsorvido foi re-suspenso em 150 µL de etanol e após 30 min a absorção (A) foi medida usando um espectrofotômetro (λ 450 nm). A formação do biofilme foi classificada de acordo com Stepanovic et al. (2007). Produtor de biofilme forte, A: > 0,280; produtor médio de biofilme, A: 0,170-0,279; produtor fraco de biofilme, A: 0,070-0,170; nenhum produtor de biofilme, A: <0,070. Os valores foram determinados em triplicata.

4.4 Ensaio da atividade antibiofilme em microplacas de 96 poços

Os selenocianatos alílicos **1-3** foram adicionados nas microplacas de 96 poços (37,5, 75 e 150 µg/mL) e deixados durante 48 h, a 0-10 ° C. Em seguida, a solução de cada amostra foi removida da microplaca. Após, transferiram-se 20 µL do inóculo, recentemente preparado, de 10⁶ UFC/mL para

as microplacas e suplementadas com 180 μL de TSB. Após a incubação durante 48 h a 35 ° C, a cultura foi removida com a pipeta multicanal sem tocar nas paredes das microplacas. Logo, a água destilada foi vertida em cada poço estéril para enxaguar as células fracamente aderentes. Adicionou-se 150 μL de metanol durante 20 min, inverteu-se, deixou-se secar durante 30 min e corou-se com 150 μL de solução cristal violeta a 0,5%, durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso do corante foi pipetado com uma pipeta multicanal, sem tocar as pontas nos poços e lavado com água corrente, até não se observar mais o corante. O mesmo foi suspenso com 150 μL de etanol e deixado em repouso durante 30 min. A taxa de adesão do agente fúngico foi verificada medindo a absorvância por leituras usando um espectrofotômetro (λ 450 nm) e os resultados quantificados. Os valores foram determinados em triplicata.

4.5 Preparação dos enxaguantes bucais

Duas formulações, F1 e F2, na presença do sal imidazólico $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e três formulações, S1, S2, S3 contendo os selenocianatos alílicos **1**, **2**, **3** foram preparadas. As composições foram baseadas no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (2012), em que as formulações bucais devem conter: edulcorante, aromatizante, água e um corretor de pH, além da substância ativa.

Assim, as concentrações escolhidas para o composto $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ foram: 0,005% de $\text{C}_{16}\text{MImCl}$, 0,05% de sacarina sódica (Dinamica, São Paulo), 0,3% de essência hidroetanólica pimenta-menta (Delaware, Porto Alegre, Brasil), 0,05% de ácido láctico (Dinamica) e 100 mL de água (*Quantum Satis para* – qsp). A única diferença entre as formulações foi a presença (F1) ou a ausência (F2) do agente conservante (0,1% de sorbato de potássio – Dinamica), sendo este utilizado para verificar se o mesmo poderia mascarar a atividade do $\text{C}_{16}\text{MImCl}$. Formulações sem o composto ($\text{C}_{16}\text{MImCl}$), mas na presença de adjuvantes também foram preparados como controle para os ensaios da atividade antibiofilme. Além disso, duas formulações foram utilizadas como controle positivo para a atividade antibiofilme: (i) formulação contendo o cloreto de cetilpiridínio (CP), 0,05% de sacarina sódica (Dinamica, São Paulo), 0,3%

essência hidroetanólica pimenta-menta (Delaware, Porto Alegre, Brasil), 0,05% de ácido láctico (Dinamica) e 100 mL de água (*Quantum Satis para* – qsp); (ii) formulação comercial Colgate PLAX FRESHMINT® contendo 0,075% CP (Colgate). A tabela 2 resume todas as formulações usadas.

Tabela 2. Componentes e proporções para a preparação dos enxaguantes bucais na presença ou ausência do composto cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólico

Composição	C1*	C2*	F1 **	F2 **	F3 (CP)***
Sacarina sódica	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Sorbato de potássio	0,1%	-	0,1%	-	0,1%
Essência	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%
Ácido láctico	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
C ₁₆ MImCl	-	-	0,005%	0,005%	-
Cloreto de cetilpiridínio (CP)	-	-	-	-	0,05%
Água	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.

*C1 e C2: controles livres de antifúngicos; ** F1 and F2: formulações contendo C₁₆MImCl; *** F3: Formulação contendo cloreto de cetilpiridínio

Para os compostos selenocianatos alílicos, três formulações S1, S2, S3 foram preparadas conforme descrito acima. Além disso, três formulações (S1*, S2*, S3*) foram preparadas, com a ausência do sorbato de potássio. Uma formulação foi preparada unicamente com os adjuvantes (FA), e outra com os adjuvantes sem sorbato de potássio (FA*). Finalmente, preparou-se uma formulação com os adjuvantes na presença de 2% de DMSO (FAD), enquanto outra formulação continha os adjuvantes e o DMSO, mas sem o sorbato de potássio (FAD *). A Tabela 3 resume cada uma das formulações descritas acima. Listerine® (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil, lote no 0895B24) foi usado como controle positivo para a atividade antibiofilme. Componentes ativos: eucaliptol (0,092% v/v), timol (0,064% v/v), salicilato de metila (0,060% v/v) e mentol (0,042% v/v). Componentes inativos: água, álcool (21,6%), solução de sorbitol, aromatizantes, poloxâmero 407, ácido benzóico, sacarina de sódio e benzoato de sódio).

Tabela 3. Componentes e proporções para a preparação dos enxaguantes bucais na presença ou ausência dos selenocianatos alílicos

Composição	S1–S3	(S1–S3)*	FA	FA*	FAD	FAD*
Sacarina sódica	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sorbato de potássio	0,1	-	0,1	-	0,1	-
Essência	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Ácido láctico	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1, 2 ou 3	0,015	0,015	-	-	-	-
DMSO	1,5	1,5	-	-	2	2
Água	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.

Todos os números são expressos em porcentagem. * Sem sorbato de potássio. FA: formulação com adjuvantes. FAD: formulação com adjuvantes e DMSO.

4.6 Atividade Antibiofilme em resinas acrílicas

A atividade antibiofilme *ex vivo* das formulações foi avaliada mediante contagem de colônias em $\log(\text{UFC}/\text{cm}^2)$ e com o uso do reagente colorimétrico MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich Co ., St. Louis, MO)).

4.6.1 Formação do biofilme e avaliação da atividade antibiofilme das formulações

Este procedimento foi baseado, aplicando pequenas modificações, em um método previamente publicado por Bergamo et al. (2015a). Para o teste de formação do biofilme, os corpos de prova a base de resina acrílica (Autopolimerizável, Jet Líquido) (1x1 cm) foram adicionados em 9 mL de Água Peptonada (AP) (HiMedia) contendo 1 mL do inóculo fúngico (10^6 UFC/mL), e incubados durante 24 h, a 32 °C. Após a incubação, os corpos de prova foram lavados com AP (para remover as células fracamente aderentes) e adicionado a outro frasco contendo 5 mL de AP, seguido de sonicação (40 kHz por 10 min) para promover o desprendimento das células do biofilme. Após o procedimento

de sonicação, a solução foi diluída dez vezes, permitindo a determinação de UFC. Logo, 20 μL de cada diluição foram semeados em AS. As placas foram incubadas durante 24 h a 32 $^{\circ}\text{C}$. As UFC/cm² foram determinadas. Todas as contagens foram realizadas em triplicata.

Para a avaliação da atividade antibiofilme, antes do procedimento descrito acima, os corpos de prova (1x1 cm) foram pré-tatados por imersão durante 1 minuto nas formulações previamente preparadas C1, C2, F1, F2, F3 e Colgate, S1-S3, S1-S3*, FA, FA*, FAD, FAD* e Listerine®. Assim, o mesmo crescimento do biofilme e a contagem de UFC foram realizados (Figura 8).

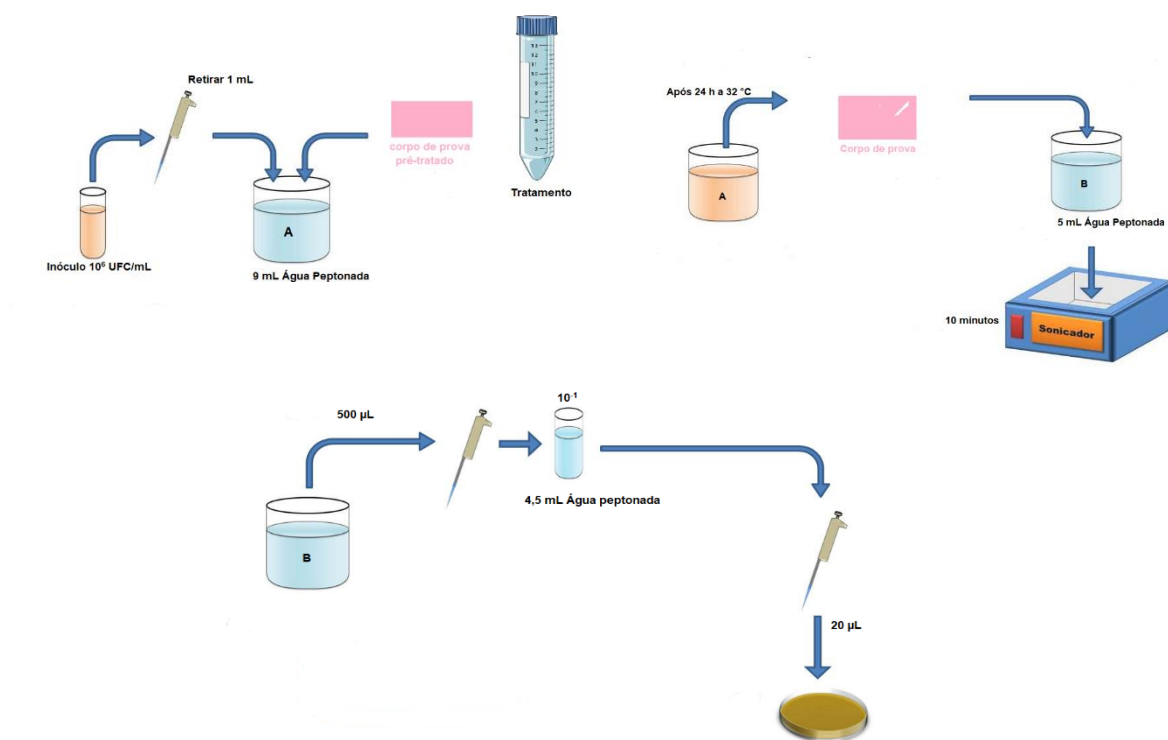


Figura 8. Esquema da atividade antibiofilme com corpo de prova. Fonte: Próprio autor.

4.6.2 Ensaio da formação do biofilme e avaliação da atividade antibiofilme em corpos de prova com a utilização do corante MTT

A formação do biofilme foi avaliada utilizando uma versão modificada de um método previamente reportado por Ramage et al. (2001). Primeiramente, as cepas foram cultivadas em AS, por 24 h, a 35 °C. Para a preparação do inóculo, as cepas foram colocadas no meio de cultura TSB e isso proporcionou uma suspensão de 10^6 UFC/mL (5 a 7 UFC/mL) de células jovens. Então, 200 µL de inóculo foram adicionados em cada microplaca de poliestireno de 24 poços estéreis, em que os corpos de prova (resina acrílica, 1x1 cm) foram inseridos juntos a 1,8 mL de TSB. As placas foram incubadas por 24 h, a 35 °C para promover a formação do biofilme no material da prótese. Os corpos de prova foram lavados com água destilada estéril para remover as células fracamente aderentes. 150 µL do reagente colorimétrico MTT (5 mg/mL) foi adicionado as microplacas, seguido de incubação por 3 h a 35 °C. Álcool isopropílico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado para extrair os cristais de formazan, responsáveis pela coloração das células viáveis no biofilme. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), onde os comprimento de ondas (570 e 690) foram ajustados, subtraindo os valores calculados das absorbâncias de 570 pelos valores encontrados para o comprimento de onda 690 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a atividade antibiofilme, antes do procedimento de contagem em UFC descrito acima, as resinas acrílicas (1x1 cm) foram pré-tratadas por imersão nas formulações previamente preparadas: C1, C2, F1, F2, F3 e Colgate. O crescimento do biofilme e o procedimento colorimétrico foi realizado de igual forma do acima descrito.

4.7 Análise ultraestrutural do biofilme de *Candida tropicalis* na superfície da resina acrílica usando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi utilizada para visualizar a formação do biofilme de *C. tropicalis* (72P) com e sem a aplicação das formulações F2 (com 0,005% de C₁₆MImCl), F3 (com 0,05% de CP) e a solução aquosa do composto C₁₆MImCl. Além disso, foi utilizada a cepa 72A para avaliar a formação do biofilme com e sem a aplicação das formulações S1–S3, (S1–S3)*, FA, FA*, FD, FD* e Listerine. Os corpos de prova utilizados no teste da inibição do biofilme foram transferidos para outra microplaca de 24 poços contendo 2,5% de glutaraldeído (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) em 0,1 mol/L de tampão cacodilato (Sigma-Aldrich) e incubados à temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram desidratadas em series de etanol (10, 35, 45, 90 e 100%) e secadas no ponto crítico utilizando CO₂ líquido. As amostras foram revestidas com ouro e analisadas usando o microscópio eletrônico EVO-50HV Carl Zeiss (Carl Zeiss Company, Oberkochen, Alemanha). As imagens foram capturadas em diversas amplitudes e regiões.

4.8 Avaliação da Hipoalergenicidade (HET-CAM)

Ovos Lohmann brancos, frescos e férteis foram utilizados no teste HET-CAM. Os ovos foram mantidos sob condições de incubação otimizadas (temperatura entre 38 a 39 °C e umidade relativa entre 55 e 60%), durante 10 dias. No décimo dia, a casca do ovo foi cuidadosamente removida com uma ferramenta rotatória (Dremel, WI). Logo, 0 a 3 mL de cada amostra (F2, solução aquosa do composto C₁₆MImCl, S1–S3, (S1–S3)*, FA, FA*, FD, FD*) foram adicionados em cada ovo, respectivamente. Foi utilizado como controle negativo do teste a solução salina 0,9 % e o controle positivo a solução de NaOH a 0,1 mol/L. Os efeitos irritantes das amostras foram observados após 30 segundos, 2 min e 5 min da aplicação. Os resultados da pontuação de irritação (PI) foram dados de acordo com a equação, onde: 0 a 4,9 foi denotado como não irritante (ou praticamente sem irritação); 5,0 a 21 foi denotado como irritante (irritação moderada/grave ou extrema) (ICCVMA 2010):

$$PI = \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de Hemorragia})}{300} \right) x 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de Lise})}{300} \right) x 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de Coagulação})}{300} \right) x 9 \right)$$

Onde: “tempo de hemorragia”, o “tempo de lise” e o “tempo de coagulação” (Figura 9) são o tempo (em segundos) da primeira aparição de hemorragias sanguíneas, lise vascular e coagulação protéica, respectivamente.

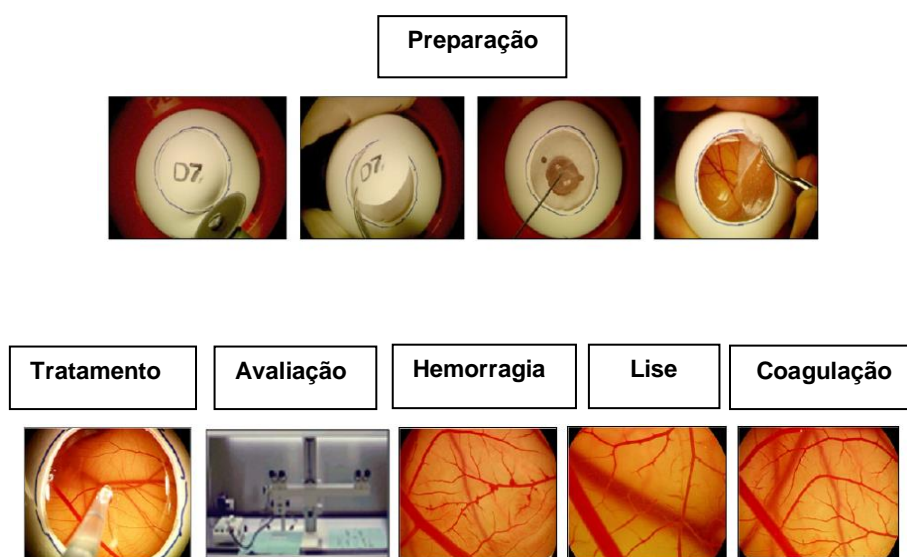


Figura 9. Preparação do teste HET-CAM e diferentes pontos finais avaliados: “tempo de hemorragia”, o “tempo de lise” e o “tempo de coagulação”.
Fonte: Eichenbaum et al., 2013.

4.9 Amostras utilizadas para o estudo de associação polímero/fármaco

4.9.1 Cepas

Cepas de *C. tropicalis* (72A, 72P, 57A), *C. glabrata* (RL22, RL24, RL25), *C. parapsilosis* (RL32, RL11, RL20), *C. lusitanae* (RL28) (depositado na biblioteca do Laboratório de Micologia Aplicada na Universidade Federal do Rio

Grande do Sul (UFRGS - Brasil), e duas cepas comerciais de *C. albicans* (ATCC18804) e *C. krusei* (ATCC6258) foram utilizadas neste estudo. Todas as cepas foram identificadas fenotipicamente através do sistema automatizado *Vitek Yeast Biochemical Card* (BioMerieuxVitek, Hazelwood, Mo.). As cepas foram acondicionadas em geladeira e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA; Himedia).

4.9.2 Preparação das soluções dos polímeros (PVOH e PDDA) e dos fármacos antifúngicos

O PVOH (Nippon Synthetic Chemical Industry) (Figura 6) e PDDA (Sigma-Aldrich) (Figura 7) foram preparados em solução aquosa em uma concentração de 20 mg/mL.

Solução-estoque de anidulafungina (AND, Pfizer®, 62,5 µg / mL), CP (Dinamica, 3,8 µg/mL) e C₁₆MImCl (IoLiTec; 500 µg/mL) foram preparados em água destilada. A anfotericina B (AMB, Inlab; 80 µg/mL), itraconazol (ITR, Cristalia®, 2,560 mg/mL) e cetoconazol (CTZ, Cristalia®, 2,560 mg/mL) foram preparados em água destilada e DMSO e armazenadas a - 4 ° C.

4.9.3 Teste de Suscetibilidade aos agentes antifúngicos

Foram realizados testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos comerciais, ao C₁₆MImCl e aos polímeros (PVOH e PDDA) para avaliar a sensibilidade ou resistência para todas as cepas. As CIMs foram determinadas pela técnica da microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) levando em consideração as atualizações do documento M27-S4 (Quarto Suplemento Informativo, 2012). A preparação do inóculo e a microdiluição em caldo é descrito conforme a seção 4.2.1 e 4.2.2, respectivamente.

Os agentes antimicrobianos comerciais de diferentes classes, como a AND (equinocandinas), AMB (polienos), CTZ (imidazóis), ITR (triazóis), bem

como o C₁₆MImCl e CP (fármacos iônicos) foram avaliados na presença (proporção 1:1, 99:1 e 1:99) ou ausência dos polímeros neutro e iônico (PVOH e PDDA), respectivamente.

Os compostos foram testados na concentração de 1000 µg/mL (PVOH e PDDA), 25 µg/mL (C₁₆MImCl), AND (32 e 0,03125 µg/mL), 4 µg/mL (AMB), 128 µg/mL (ITR e CTZ), 0,19 µg/mL (CP). Na proporção 1:1, a combinação dos compostos foram testados nas seguintes concentrações: 1000/25 (PVOH ou PDDA/C₁₆MImCl), 1000/32 (PVOH ou PDDA/AND), 1000/0,03125 (PVOH ou PDDA/AND), 1000/4 (PVOH ou PDDA/AMB), 1000/128 (PVOH ou PDDA/ITR), 1000/128 (PVOH ou PDDA/CTZ), 1000/0,19 (PVOH ou PDDA/CP).

Logo, os polímeros foram testados com os antifúngicos (AND e AMB) nas proporções 99:1 e 1:99 nas seguintes concentrações calculadas pelo valor de CIM (µg/ mL): 31,25/0,12 - 1000/4 - 125/0,5 (PVOH/AMB, respectivamente); 500/0,015 - 1,95/0,0625 - 1000/0,031 - 15,62/0,00048, 7,8/0,00024 (PVOH/AND, respectivamente); 3,9/0,015 - 250/1 - 62,5/0,25 - 15,625/0,0625 - 31,25/0,1225 (PDDA/AMB, respectivamente); 3.9/0.00012 (PDDA/AND, respectivamente).

Para rejeitar a possibilidade de resultados falsos positivos, antes de iniciar os ensaios de suscetibilidade de todos os antifúngicos, DMSO 2% diluído em RPMI foram testados frente a todas as cepas incluídas neste trabalho e comparados com o controle positivo para demonstrar que essa concentração de diluente não foi capaz de afetar o crescimento das células fúngicas.

4.9.4 Leitura dos resultados

A leitura foi realizada de forma visual, observando o crescimento ou não dos aglomerados de células fúngicas no fundo da cavidade da placa. A CIM para a AND foi avaliada como a menor concentração do fármaco que promoveu 50% de inibição quando comparada ao crescimento de cada cepa (CLSI, 2008). Para a AMB, C₁₆MImCl, CP, CTZ, PVOH e PDDA (CLSI, 2008) foram as menores concentrações que promoveram 100% de inibição.

Os critérios de definição de suscetibilidade ao ITR e AND foram

definidos conforme a CLSI levando em consideração o documento M27-S4. Nenhum critério de interpretação para CTZ e AMB está disponível no documento CLSI M27-S4. Para AMB e CTZ, foram utilizados pontos de corte de CIM recomendados por pesquisadores anteriores (Candido et al., 1998; Pfaller et al., 2012). CIM de AMB $< 1 \mu\text{g/mL}$, e para CTZ $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ foram consideradas susceptíveis. Isolados com CMI de $0,25 \mu\text{g/mL}$ a $0,5 \mu\text{g/mL}$ para CTZ foram considerados como sendo sensíveis à dose dependente. As cepas com CIMs $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ para AMB, $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ para CTZ foram consideradas como resistentes.

4.10 Avaliação do Potencial Zeta

O tamanho da partícula e o potencial zeta (mV) dos compostos, fármacos (CTZ, CP, AND, AMB, $\text{C}_{16}\text{MImCl}$, ITR), polímeros (PVOH, PDDA) ou em associação (polímero/fármaco, proporção 1:1) foram determinados por espalhamento de luz dinâmica e mobilidade eletroforética, respectivamente, utilizando um equipamento Lite Sizer 500 (Anton Paar, Austria) em cubeta Omega. Ambas as medidas foram realizadas na mesma cubeta e em sequencia, possibilitando uma maior reprodutibilidade de resultados.

4.11 Microscopia Óptica e Espectroscopia Raman

Oito sistemas (AND, AMB, PVOH, PDDA, AND/PVOH, AND/PDDA, AMB/PVOH, AMB/PDDA) em meio aquoso, na proporção 1:1 foram analisados para avaliar a combinação entre fármaco e o polímero (interação, dispersão). Para isso a microscopia óptica e a Espectroscopia Raman foram utilizadas para tal finalidade. Para ambas as análises, utilizou-se as mesmas amostras preparadas pela técnica de *drop casting* em lamínula de vidro microscópica, seguida de secagem sob vácuo por 1 h a 40°C .

As imagens de microscopia óptica foram realizadas empregando-se um Microscópio Óptico Olympus BX51M, com luz refletida. As imagens no modo *Bright Field* foram realizadas com luz polarizada e objetiva de 20x, sem e com duplicador (40x). As imagens em *Dark Field* foram realizadas com objetiva de 20x, sem e com duplicador (40x).

Para a espectroscopia Raman, os espectros foram obtidos utilizando espectrômetro Raman (Witec Alpha 300R) acoplado a um microscópio óptico, este empregado para se obter uma imagem da amostra indicando onde o laser será incidido. Os parâmetros experimentais utilizados foram lente de 50x, linha de excitação de 532 nm (laser verde), grades de difração (para separação das bandas) de 600/mm e tempo de integração (tempo para coleta dos dados) de 1 s. Os espectros obtidos foram processados pelo software Witec 3.0. O software Origin 9.0 foi empregado para tratamento dos dados dos mesmos.

5. ARTIGOS

5.1 Artigo 1

Este artigo foi publicado na revista “Journal of Applied Microbiology”. QUALIS B1 (JCR 2016: 2,099).

Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation

V.Z. Bergamo^{1,2}, R.K. Donato^{3,4}, M.C. Nemitz⁵, G.A.X. Acasigua⁶, B.S. Selukar⁴, W. Lopes⁸, D.F. Dalla Lana^{2,5}, M.L. Teixeira⁷, H.F. Teixeira⁶, H.S. Schrekker^{*4}, A.M. Fuentefria^{*1,2,6}

¹ Institute of Basic Health Sciences Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Laboratory of Applied Mycology, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ MackGraphe (Graphene and Nano-Material Research Center), Mackenzie Presbyterian University, São Paulo, Brazil

⁴ Laboratory of Technological Processes and Catalysis, Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁵ Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁶ Graduate Program in Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁷ Veterinary Medicine Course. Federal Institute of Santa Catarina, Brazil

⁸ Department of Molecular Biology and Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Running Head: Mouthwash formulations against *Candida* biofilms

***Corresponding author:** Alexandre M. Fuentefria, PhD

Laboratory of Applied Mycology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil. E-mail: alexandre.fuentefria@ufrgs.br Tel: +55 51 3308 5244.

***Corresponding author:** Henri S. Schrekker, PhD

Laboratory of Technological Processes and Catalysis, Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
E-mail: henri.schrekker@ufrgs.br Tel: +55 51 3308 6274.

Abstract

Aims: This study demonstrates the development of a mouthwash formulation containing the imidazolium salt (IMS) 1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride (C₁₆MImCl), considering its stability and efficacy against *Candida* sp. Biofilm formation.

Methods and Results: A variety of *in vitro* test methods were applied, assessing contaminated acrylic resin strip specimens before and after applying the mouthwash formulations. The formulation using C₁₆MImCl presented a similar antibiofilm activity to cetylpyridinium chloride one and a commercial mouthwash, but at a 10 times lower concentration. Scanning electron microscopy imaging demonstrated that the selected mouthwash preparation fully destroys the biofilm cells, while with the hypoallergenicity test no irritant effect was observed in *ex vivo* model.

Conclusions: The results presented herein indicate a high potential for imidazolium salts application as mouthwash agents that can eliminate *Candida* biofilm growth at very low concentrations.

Significance and Impact of the Study: This study demonstrates a new and effective antibiofilm formulation containing the IMS C₁₆MImCl. These findings suggest the IMS' use as mouthwash formulations active ingredient against *Candida* biofilms on oral surfaces, as it outperforms the often used cetylpyridinium chloride at a 10 times lower concentration.

Keywords: *Candida*, Antibiofilm, Imidazolium Salts, Mouthwash, Antifungal

Introduction

Prostheses applications are the treatment of choice in the oral rehabilitation of edentulous patients. Dentures and removable total prostheses supported by teeth or retained by implants present an acrylic resin that replaces the lost tissue (Fonesca *et al.* 2013). However, changing this oral tissue with such restorative materials constitute conditions for microorganism colonization. (Gendreau and Loewy 2011).

Acrylic resin prostheses have a key role as microorganism reservoirs, increasing the fungi colonization risk especially by *Candida* genus (Wen *et al.* 2016). The use of these prostheses provoke injuries by the material's contact with the oral mucosa, favoring *Candida* species retention, proliferation and, consequently biofilm formation. Immunodepressed patients are the group with the highest disease development risk, given the involved organisms' opportunistic nature (Ramage *et al.* 2004). Although *C. albicans* is the most commonly isolated species, often *Candida* non-*albicans* species, such as *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, are found in the palatal mucosa and prosthesis surface (Avrella and Goulart 2008; Favalessa *et al.* 2010). These species are often related to persistent infections due to their biofilm forming capacity, dramatically increasing their resistance to chemotherapy (Chandra and Mukherjee 2015).

Biofilms are microbial communities living within an also microbial based biopolymer matrix (Flemming *et al.* 2011). This matrix is composed of a wide variety of proteins, carbohydrates and phosphate, and the extracellular material composition depends on factors like growth environment and species (Conover *et al.* 2011; Al-Fattani and Douglas, 2006). For instance, the *C. albicans* biofilm matrix is constituted of a high carbohydrate content (32.2% glucose) (Al-Fattani and Douglas, 2006), the *C. tropicalis* biofilms' matrix consists mainly of amino sugar (27.4% hexosamine) and the *C. glabrata* biofilm matrix presents high concentrations of both proteins and carbohydrates (Silva *et al.* 2009).

Among the usual prostheses' cleaning methods are the application of mouthwashes containing cetylpyridinium chloride (CP) in their formulation (Fu *et*

al. 2014). The CP is a monovalent cationic surfactant, belonging to the quaternary ammonium compounds, presenting a broad antimicrobial spectrum (Haps *et al.* 2008; Moreira *et al.* 2009; Shim *et al.* 2012). This compound is also known to promote a considerable biofilm reduction, producing improvements in patients with prosthetic stomatitis (Carson *et al.* 2009; Cavalcanti *et al.* 2009; Moreira *et al.* 2009; Wen *et al.* 2016). However, despite its widespread use, the CP often present adverse effects, such as; dental bleaching, burning mouth syndrome, recurrent ulceration and increased calculus formation, especially when used for a long time (Moreira *et al.* 2009; Thomas 2011).

Imidazolium salts (IMS) are a class of synthetic organic salts presenting promising antimicrobial activities (Gilmore *et al.* 2011). These IMS are formed by the combination of an inorganic anion with a bulky asymmetric organic cation, presenting melting points below 100 °C. They present a range of interesting characteristics, such as; tunable water solubility, negligible vapor pressures, negligible flammability and low toxicity to human leukocytes (Franzoi *et al.* 2011; Schrekker *et al.* 2013; Dalla Lana *et al.* 2015). We previously demonstrated that IMS have strong antibiofilm activity against *C. tropicalis* multidrug-resistant isolates (Bergamo *et al.* 2014), both in solution or applied on a commercial catheter surface. Moreover, the IMS activity is extremely effective for eliminating pre-formed *C. tropicalis* biofilms, using much lower concentrations than the antimicrobial of choice (chlorhexidine) for hospital practices (Bergamo *et al.* 2015).

Considering the previously obtained results, in this study we developed a mouthwash formulation containing an IMS with known antifungal properties against *Candida* biofilm and evaluated its efficacy for treating acrylic resin prostheses. In addition, for prospecting the commercial application, the mouthwash formulation's hypoallergenic effects, for detecting mucous membrane toxicity, were determined by Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane test (HET-CAM).

Materials and methods

Microbial strains

Three clinical isolates of *C. tropicalis* (57A, 72A, 72P), *C. glabrata* (RL22, RL24, RL25) and *C. parapsilosis* (RL11, RL20, RL32) belonging to the Applied Mycology Laboratory's mycology collection at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Brazil, and one commercial *C. albicans* strain (ATCC18804®), were used in this study. The isolates from the oral mucosa or candidiasis used in this study were identified by Vitek® Yeast Identification Card.

Mouthwash preparation

Two formulations, F1 and F2, were prepared with the synthesized imidazolium salt (IMS) 1-n-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride (C₁₆MImCl, Schrekker *et al.* 2008) (Fig.1b). The compositions were based on the National Formulary of Brazilian Pharmacopea (2012), in which the mouthwash formulations must contain at least an edulcorant, flavouring, water, and a pH corrector, besides the active substance. Thus, the components chosen for both formulations were; 0.005 % C₁₆MImCl, 0.05 % sodium saccharin (Dinamica, São Paulo, Brazil), 0.3 % peppermint hydroethanolic essence (Delaware, Porto Alegre, Brazil), 0.05 % lactic acid (Dinamica, São Paulo, Brazil) and 100 mL of water (*quantité suffisante pour* - qsp). The only difference between the formulations was the presence (F1) or absence (F2) of the preservation agent (0.1 % potassium sorbate, Dinamica, São Paulo, Brazil). Formulations without C₁₆MImCl, but in the presence of adjuvants (C1 and C2), were also prepared as controls for the antibiofilm assays. Two formulations were used as positive controls; (i) formulation containing 0.05 % cetylpyridinium chloride (CP) (Dinamica, São Paulo, Brazil) (Fig.1a), 0.05 % sodium saccharin, 0.3 % peppermint hydroethanolic essence and 0.05 % lactic acid in 100 mL water; and (ii) the commercial formulation Colgate PLAX FRESHMINT® containing 0.075 % CP (Colgate). Table 1 summarizes all used formulations.

Table 1

Figure 1

Minimal inhibitory concentration (MIC)

The MIC of C₁₆MImCl was determined by the broth microdilution

method according to the M27-A3 protocol CLSI (CLSI, M27-A3 2008). MIC values were defined as the lowest concentration of compounds at which the microorganisms tested did not demonstrate visible growth after 48 h. The concentration range tested for C₁₆MImCl antibiofilm activity was from 250 to 0.47 µg ml⁻¹, based on the MIC values obtained.

Antibiofilm activity

The formulations' *ex vivo* antibiofilm activity was approached by colony counting in log(CFU cm⁻²) and colorimetric MTT reagent ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich). In both tests, acrylic resin specimens (1 x 1 cm) were utilized.

Biofilm formation assay and antibiofilm activity evaluation on acrylic resin strips

This assay was based, applying minor modifications, on a previously published method (Bergamo *et al.*, 2014). For the biofilm formation assay, sterile acrylic resin pieces (1x1 cm) were added into 9 ml of peptone water containing 1 ml of fungal inoculum and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the specimens were rinsed with peptone water (to remove weakly adherent cells) and added to another flask containing 5 ml of peptone water, followed by sonication (40 kHz for 10 min) for the biofilm cells detachment. After sonication, the solution was diluted (x10), allowing CFU determination, and then 20 µl of each dilution was seeded in Sabouraud agar. The plates were incubated for 24 h at 37 °C, and the CFU cm⁻² values were determined. All counts were made in triplicate.

For the antibiofilm activity evaluation, prior to the CFU counting procedure described above, the sterile acrylic resin pieces (1x1 cm) were pre-treated by immersion for 1 min into the previously prepared formulations C1, C2, F1, F2, F3 and Colgate. Then, the same biofilm growth and CFU counting procedure was performed.

24-well plates biofilm formation assay and antibiofilm activity assay on acrylic resin strip

The biofilm formation was evaluated using a modified version a method previously reported by Ramage *et al.* (2001). Isolates were grown on Sabouraud agar for 24 h at 35 °C. For the preparation of the inoculum, the isolates were placed on TSB medium (Tryptose Soy Broth - Sigma-Aldrich) and this afforded 10^6 CFU ml⁻¹ suspensions (5-7 cultures) from young cultures. Then, 200 µl of inoculum were added to each well of a pre-sterilized commercial polystyrene 24-well plate, in which acrylic resin specimens (1x1 cm) were inserted together with 1.8 ml of TSB. The plates were incubated for 24 h at 35 °C to promote fungal biofilm formation on the prosthetic material. The specimens were then washed with sterile water to remove loosely adherent cells. 150 µl of a colorimetric MTT reagent aqueous solution (5 mg ml⁻¹) were added in each well, followed by incubation for 3 h at 35 °C. Isopropyl alcohol (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) was used to extract the MTT formazan crystals, which were responsible for the viable cells staining in the biofilm. The absorbance was measured in a SpectraMax microtiter plate reader, where a dual wavelength of 570 to 690 nm was adjusted, subtracting the calculated absorbance values at 570 nm by the ones at 690 nm. All biofilm experiments were performed in triplicate.

For the antibiofilm activity assay, , prior to the CFU counting procedure described above, the acrylic resin strips (1x1 cm) were pre-treated by immersion into the previously prepared formulations C1, C2, F1, F2, F3 and Colgate. Then, the same biofilm growth and MTT colorimetric procedure was performed.

***Candida tropicalis* biofilm ultrastructural analysis on the acrylic resin surface using scanning electron microscopy (SEM)**

Scanning electron microscopy (SEM) was used to visualize the *Candida tropicalis* (72P) biofilm formation with and without the application of the formulations F2 (with 0.005 % C₁₆MImCl), F3 (with 0.05 % CP) and an aqueous solution of C₁₆MImCl (0.005 %). The specimens used in the biofilm inhibition test were transferred to another microtiter plate containing 2.5 % glutaraldehyde (Merck) in 0.1 M cacodylate (Sigma-Aldrich) buffer and incubated at room

temperature for 5 min. The samples were serially dehydrated in ethanol (10, 35, 45, 90 and 100 %) and dried in a critical-point dryer using liquid CO₂. The samples were coated with gold and observed using an EVO-50HV Carl Zeiss scanning electron microscope. The images were captured at various magnifications and regions.

Hypoallergenicity evaluation

Fresh and fertile white eggs Lohmann (Lohmann selected Leghorn, LSL) were used in the HET-CAM test. The eggs were kept under optimized incubation conditions (temperature between 38 to 39 °C and humidity between 55 and 60 % for 10 days). On the 10th day, the egg shell, around the airspace, was carefully removed with a rotary tool (Dremel, WI). Afterward, 0.3 ml of each sample were added in each egg, respectively (negative control - 0.9 % saline solution; positive control - 0.1 M NaOH solution and mouthwash formulation containing the C₁₆MImCl, F2). The samples' irritant effects were observed after 30 s, 2 min and 5 min from the application. The irritation score (IS) results were given according to the equation (1), where; from 0 to 4.9 was denoted as nonirritant (or practically no irritation) and from 5.0 to 21 was denoted irritant (moderate/severe or extreme irritation) (ICCVMA 2010):

$$IS = \left(\left(\frac{(301 - Hemorrhage\ Time)}{300} \right) x 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - Lysis\ Time)}{300} \right) x 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - Coagulation\ Time)}{300} \right) x 9 \right) \quad (1)$$

Where; *Hemorrhage time*, *Lysis time* and *Coagulation time* are the time (in seconds) of the first appearance of blood hemorrhages, vessel lysis and protein coagulation, respectively. The IS, when based on this formula, presents a maximum value of 21.

Statistical analysis

Each experiment's data were expressed by the mean of three independent determinations and respective standard deviation (SD). Differences among groups were tested by One-Way ANOVA, and Tukey test with $\alpha=0.05$ (Origin Pro.®versão 7.0).

Results

Mouthwash antibiofilm activities

In the broth microdilution test from the planktonic cells, the MIC of C₁₆MI_mCl, for all isolates tested, ranged from 15.25 to 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Based on this test, the concentration 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was chosen for producing the rinsing formulation and the subsequent antibiofilm assays.

In the biofilm formation assay, using the CFU cm^{-2} count on acrylic resin surface, all the strains were capable of forming biofilms *ex vivo* (Table 2). The strains 57A, 72A, 72P, RL22, RL24, RL25 were the strongest and the strains RL11, RL20, RL32, ATCC18804[®] were the weakest biofilm formers.

Table 2

Concerning the biofilm inhibition, the controls C1 and C2 showed $\log(\text{CFU cm}^{-2})$ values ranges of 4.6 - 5.9 and 4.9 - 5.9, respectively. When the formulations were applied, the ATCC18804[®] strain presented the lowest, while the isolates 57A, RL22, RL24 and RL25 the highest biofilms inhibition values. The antibiofilm activity presented by F1 was 4.4 for the isolates 72A and 72P, and 3.7 for isolate ATCC18804[®]. However, F2, F3 and Colgate presented 0 (total inhibition) for all isolates.

In the antibiofilm activity evaluation with colorimetric MTT reagent, the data were in accordance with the $\log(\text{CFU cm}^{-2})$ results for the F2. Besides, it was verified the occurrence of a statistically different antibiofilm activity between F2 and its control ($p<0.05$ %). The same behavior was not observed for F1, since its antibiofilm activity was statistically similar to its control ($p>0.05$ %) for four of nine isolates (Fig. 2).

Figure 2

The chosen F2 formulation, which presented no interference from the adjuvants present in the formulation, had its antibiofilm activity compared with two products containing CP (F3 and Colgate, Fig. 3). For the RL24 isolate of *C. glabrata*, F2 presented statistical difference only when compared with F3. On the other hand, for the *C. tropicalis* 72P isolate, F2 presented significantly higher ($p < 0.05$) activity than F3 and Colgate. For the other isolates, here represented with RL32 (*C. parapsilosis*), and ATCC18804[®] (*C. albicans*), the F2 activity was significantly similar ($p > 0.05$) to that F3 and Colgate.

Figure 3

Scanning electron microscopy analysis (SEM)

SEM was used for the ultrastructural analysis of *C. tropicalis* biofilm on the acrylic resin surface, here represented by the 72P strain. The untreated specimen (Fig. 4 a, b and c) presented extracellular material formation and biofilm colony structuration. Many embedded cells can be observed in the resulting network, where fibrils with extended structures connect the neighboring cells. For the specimens exposed to F2 (0.005 % C₁₆MImCl, Fig. 4 f), F3 (0.05 % CP, Fig. 4 d) and C₁₆MImCl aqueous solution (0.005 %, Fig. 4 e) the biofilm formed was fully (Fig. 4).

Figure 4

Evaluation of hypoallergenicity

The HET-CAM test shows the effect of different concentrations of the substances in function of time. The numerical time-dependent scores are summed to give a single numerical value indicating the substance's irritating potency on a scale with a maximum value of IS = 21 (by equation (1)). In this experiment, the IS for C₁₆MImCl aqueous solution was 4.05, and 3.08 for F2 (Fig.

5). According to the methodology, only results above 4.9 are classified as slight irritant. Gettings *et al.* (1996) classify a substance as irritant only for IS \geq 5.1.

Figure 5

Discussion

The strains presenting the strongest biofilm formation capacity on the acrylic resin surface were *C. tropicalis* and *C. glabrata*, followed by *C. parapsilosis* and *C. albicans* (Table 2). Corroborating with our findings, Jayatilake *et al.* (2006) and Lima-Neto *et al.* (2011) demonstrated that *C. tropicalis* exhibits stronger ability than *C. parapsilosis* and *C. glabrata* to colonize reconstituted human epithelium, and the *C. albicans* adherence to epithelial cells is stronger than that of *C. parapsilosis*.

Despite the previous knowledge of the IMS antifungal and antibiofilm activity (Bergamo *et al.* 2014; Bergamo *et al.* 2015), the formulations developed in this study allowed comparing between pure a substance vs. its formulation, thus expanding the knowledge for the use of these IMS as applicable pharmaceutical drugs. The C₁₆MImCl concentration used both for the aqueous solution and formulations (F1 and F2) was 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, as at this dosage it was capable of effectively inhibiting microorganism growth. It worth noting that this concentration is ten times lower than the common CP dosage used in prepared or commercial formulations (Corbin *et al.* 2011; Shim *et al.* 2012). The structural similarity between C₁₆MImCl (presenting a positively charged imidazolium ring) and CP (presenting a positively charged pyridinium ring) (Fig. 1) suggests an important role of the cationic head in inhibiting pathogenic species of *Candida* spp. (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. albicans*). Other studies confirm that the molecules with long aliphatic chain functionalized cations have a potential amphiphilic balance, essential for both their antifungal and antibiofilm activities (Pernak *et al.* 2003; Carson *et al.* 2009; Bergamo *et al.* 2014; Dalla Lana *et al.* 2015).

The other formulation ingredients choice was based on a mouthwash

composition containing CP reported in the National Formulary of Brazilian Pharmacopea (2012). Therefore, sodium saccharin was used as an edulcorant, peppermint hydroethanolic essence as a flavouring agent, lactic acid as the pH corrector for the oral compatibility (pH = 4.0 to 5.0) and water qsp as a vehicle. The F1 and F2 formulations differed solely by the presence or absence of the preservative (potassium sorbate). The choice of this conserving adjuvant was based on its presence in the commercial formulation Colgate (used as a reference). As a manner to verify the interference of all excipients present, the same formulations were prepared without the IMS and used as controls (C1 and C2) for the antibiofilm assays.

All formulations containing the C₁₆MImCl showed *ex vivo* antibiofilm activity against *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. albicans* (inhibition in logCFU cm⁻², Table 2). However, for the MTT assay (Fig.2), F1 showed a similar antibiofilm activity with its control for four isolates, while F2 showed for all isolates statistically different activity from control. This indicates that the presence of potassium sorbate in F1 could mask the IMS activity. Another possibility is that it could interact or ion exchange with the IMS (as they are both ionic species) affecting the C₁₆MImCl activity. Therefore, formulation F2 was selected for the continuity of experiments.

The antibiofilm activity of F2 was compared with the antibiofilm activity of the two positive controls used in this study: (i) 0.05 % CP formulation (F3) and (ii) a commercial mouthwash (Colgate). Both the log(CFU cm⁻²) and MTT assay results confirmed that F2 exerts a similar or even stronger antibiofilm effect than F3 and Colgate, which are preparations widely used by patients in dental routine. These data encourage the use of C₁₆MImCl as an alternative for oral candidiasis and prosthetic stomatitis treatments (Fu *et al.* 2014), especially because this activity was achieved at a concentration one order of magnitude lower than in the case of the CP based formulations.

Usually, biofilms are thought of as hundreds of thousands of cells encased in a matrix and attached to a surface, but they can also contain as few as dozens of cells simply arranged as a small cluster or aggregate (Stacy *et al.* 2016). The scanning electron microscopy technique is widely used to evaluate

the microorganisms' cell structure damage caused by compounds (Douglas 2003). In this study, the SEM images showed that biofilms formed by *C. tropicalis* consisted of a dense network of yeasts, germ tubes, hyphae and pseudohyphae. Large amounts of extracellular matrix material were visible in these biofilms (Fig. 4 a, b and c). When cells were incubated in the presence of the pre-treated resins, yeast cells or pseudohyphae were rarely observed, a factor which contributed to the absence of biofilm architecture and extracellular matrix material (Fig. 4 d, e and f).

Studies concerning the C₁₆MImCl toxicity were recently conducted by our research group, demonstrating that this IMS is not cytotoxic, genotoxic or mutagenic for human leukocytes (Schrekker *et al.* 2013; Dalla Lana *et al.* 2015). However, we failed to find in the literature any study involving toxicity assays of healthcare products containing C₁₆MImCl, which is an essential step for the development of new products intended for human use (SCCS 2010). Among several toxicity protocols for cosmetic and pharmaceutical products, the hypoallergenicity test by the HET-CAM method is widely reported (ICCVMA 2010). During the HET-CAM test (Fig. 5), both F2 formulation and the C₁₆MImCl aqueous solution were classified as non-irritating for the embryonated mucosa, i.e. C₁₆MImCl was unable to cause irritation when in contact with biological tissue. The HET-CAM is a very sensitive test to determine the toxicological parameters, in this way, the use of such methodology is shown to be acceptable, becoming an alternative to other *in vivo* tests (ICCVMA 2010; Bubalo *et al.* 2015; Tsarpali *et al.* 2015).

Altogether, the mouthwash formulation containing C₁₆MImCl presented wide antibiofilm activity against *Candida* spp. species at very low concentrations. This effect was observed especially for the formulation containing the IMS in the absence of potassium sorbate (F2). This formulation caused morphological changes and damage to the sessile yeast cells on the acrylic resin, and at the same time was considered hypoallergenic by the HET-CAM assay. This fact strongly indicates C₁₆MImCl as a potent and safe antifungal and antibiofilm for developing mouthwash formulations.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Center of Microscopy and Microanalysis-UFRGS for the SEM facilities and CNPq for financial support by the Science without Borders public notice (special visiting scientist project 402964/2012-8) and Public Notice Universal MCTI/CNPq No 14/2013). A. M. Fuentefria, H. Teixeira and H. S. Schrekker are grateful to CNPq for the PQ fellowships.

Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

References

- Al-Fattani, M.A. and Douglas, L.J. (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* **55**, 999 – 1008.
- Avrella, D. and Goulart, L.S. (2008) Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. *RBAC* **40**, 205-207.
- Bergamo, V.Z., Donato, R.K., Dalla Lana, D.F., Donato, K.J.Z., Ortega, G.G., Schrekker, H.S. and Fuentefria, A.M. (2014) Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. *Lett Appl Microbiol* **60**, 66-71.
- Bergamo, V.Z., Balbuena, E.A., Hatwig, C., Pippi, B., Dalla Lana, D.F., Donato, R.K., Schrekker, H.S. and Fuentefria, A.M. (2015) 1-n-Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. *Lett Appl Microbiol* **61**, 504—510.
- Bubalo, M.C., Radošević, K., Srček, V.G., Das RN, P.P. and Roy, K. (2015) Cytotoxicity towards CCO cells of imidazolium ionic liquids with functionalized side chains: preliminary QSTR modeling using regression and classification based approaches. *Ecotoxicol Environ Saf* **112**, 22-28.
- Carson, L., Chau, P.K.W., Earle, M.J., Gilea, M.A., Gilmore, B.F.,

Gorman, S.P., McCann, M.T., Seddon, K.R. (2009) Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chem* **11**, 492–497.

Cavalcanti, A.L., Meneses, R.O., Da Silva, K.F., Sá, S.C.V.L., Almeida, L.F.D. and Castro, R.D. (2009) Atividade antifungica *in vitro* de enxaguatórios bucais sobre *Candida* spp. *Rev Odontol UNESP* **38**, 313-317.

Chandra, J. and Mukherjee, P.K. (2015) *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiol Spectr.* doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015.

CLSI M27 – A3 (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Third Informational Supplement. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Conover, M.S., Mishra, M. and Deora, R. (2011) Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS ONE* **6**, e16861.

Corbin, A., Pitts, B., Parker, A. and Stewart, P.S. (2011) Antimicrobial penetration and efficacy in a *in vitro* oral biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3338-3344.

Dalla Lana, D.F., Donato, R.K., Bündchen, C., Guez, C.M., Bergamo, V.Z., de Oliveira, L.F., Machado, M.M., Schrekker, H.S. and Fuentefria, A.M. (2015) Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. *J Appl Microbiol* **119**, 377–388.

Douglas, L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**, 30–6.

Favalessa, O.C., Martins, M.A. and Hahn, R.C. (2010) Aspectos micológicos e suscetibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* **43**, 673-677.

Flemming, H.C., Neu, T.R. and Wozniak, D.J. (2007) The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J Bacteriol* **189**, 7945–7947.

Fonesca, F.A., Jones, K.M., Mendes, D.C., dos Santos Neto, P.E., Ferreira, R.C., Pordeus, I.A. and Martins, A.M. (2013) The oral Health of seniors in Brazil: addressing the consequences of a historic lack of public health dentistry

in an unequal society. *Gerodontology* **32**, 18-27.

Franzoi, A.C., Brondani, D., Zapp, E., Moccelini, S.K., Fernandes, S.C., Vieira, I.C. and Dupont, J. (2011). Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. *Quim Nova* **34**, 1042-1050.

Fu, J., Wei, P., Zhao, C., He, C., Yan, Z. and Hua, H. (2014) *In vitro* antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes. *Oral Dis* **20**, 815–820.

Gendreau, L. and Loewy, Z.G. (2011) Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Int J Prosthodont* **20**, 251-60.

Gettings, S.D., Lordo, R.A., Hintze, K.L., Bagley, D.M., Casterton, P.L., Chudkowski, M., Curren, R.D., Demetrulias, J.L., Dipasquale, L.C., Earl, L.K., Feder, P.I., Galli, C.L., Glaza, S.M., Gordon, V.C., Janus, J., Kurtz, P.J., Marenus, K.D., Moral, J., Pape, W.J., Renskers, K.J., Rheins, L.A., Roddy, M.T., Rozen, M.G., Tedeschi, J.P. and Zyracki, J. (1996) The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (phase III) Surfactant - based formulations. *Food Chem Toxicol* **34**, 79 -117.

Gilmore, B.F. (2011) Antimicrobial ionic liquids. In Kokorin PA ed. *Ionic liquids: applications and perspectives*. pp 587–604. Rijeka, Croatia: InTech.

Haps, S., Slot, D.E., Berchier, C.E. and Van der Weijden, G.A. (2008) The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg* **6**, 290-303.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVMA) (2010) *The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method*. Research Triangle Park: National Toxicology Program

Jayatilake, J.A., Samaranayake, Y.H., Cheung, L.K. and Samaranayake, L.P. (2006) Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* **35**, 481–491.

Lima-Neto, R.G., Beltrão, E.I., Oliveira, P.C. and Neves, R.P. (2011)

Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* **54**, 23-9.

Moreira, A.C.A., Pereira, M.H.Q., Porto, M.R., da Rocha, L.A.P., Nascimento, B.C. and Andrade, P.M. (2009) Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. *Braz J Med Biol Res* **8**, 153-161.

National Formulary of Brazilian Pharmacopea (2012) Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: Anvisa

Pernak, J., Sobaszkievicz, K. and Mirska, I. (2003) Antimicrobial activities of ionic liquids. *Green Chem* **5**, 52–56.

Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B.L. and López-Ribot, J.L. (2001) Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **9**, 2475–2479.

Ramage, G., Tomsett, K., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L. and Redding, S.W. (2004) Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**, 53-59.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) (2010) The SCCS'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation.

Schrekker, H.S., Silva, D.O., Gelesky, M.A., Stracke, M.P., Schrekker, C.M.L., Gonçalves, R.S. and Dupont, J. (2008) Preparation, cation-anion interactions and physicochemical properties of ether-functionalized imidazolium ionic liquids. *J Braz Chem Soc* **19**, 426-433.

Schrekker, H.S., Donato, R.K., Fuentefria, A.M., Bergamo, V.Z., Oliveira, L.F. and Machado, M.M. (2013) Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. *MedChemComm* **4**, 1457–1460.

Shim, J.Y., Yim, S.B., Chung, J.H. and Hong, K.S. (2012) Antiplaque and antigingivitis effects of a mouthrinse containing cetylpyridinium chloride, triclosan and dipotassium glycyrrhizinate. *J Periodontal Implant Sci* **42**, 33-38.

Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D. and Azeredo, J. (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol* **47**, 681–689.

Stacy, A., McNally, L., Darch, S.E., Brown, S.P. and Whiteley, M. (2016) The biogeography of polymicrobial infection. *Nat Rev Microbiol* **14**, 93-105.

Thomas, E. (2011) Efficacy of two commonly available mouth rinses used as preprocedural rinses in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* **29**, 113-116.

Tsarpali, V., Belavgeni, A. and Dailianis, S. (2015) Investigation of toxic effects of imidazolium ionic liquids, [bmim][BF₄] and [omim][BF₄], on marine mussel *Mytilus galloprovincialis* with or without the presence of conventional solvents, such as acetone. *Aquat Toxicol* **164**, 72-80.

Wen, J., Jiang, F., Yeh, C.K. and Sun, Y. (2016) Controlling fungal biofilms with functional drug delivery denture biomaterials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **140**, 19-27.

Tables:

Table 1 Comparison of mouthwashes for antibiofilm activity

Composition	C1*	C2*	F1 **	F2 **	F3 (CP)***
Sodium saccharin	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
Potassium sorbate	0.1%	-	0.1%	-	0.1%
Pepper mint essence	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
Lactic acid	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
C₁₆MImCl	-	-	0.005%	0.005%	-
Cetylpyridinium chloride	-	-	-	-	0.05%
Water	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.

*C1 and C2: antifungal free controls; ** F1 and F2: C₁₆MImCl containing formulations; *** F3: Cetylpyridinium Chloride containing formulation.

Table 2 Antibiofilm activity against *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. albicans* isolates.Antibiofilm activity log (CFU cm⁻²)

Compound	Isolates									
	57A	72 ^a	72P	RL22	RL24	RL25	RL11	RL20	RL32	ATCC 18804 [®]
^a BF	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.6	5.6	5.6	4.9
^b C1	5.9	5.1	5.5	5.9	5.9	5.9	5.6	5.6	5.6	4.6
^b C2	5.9	5.3	5.6	5.9	5.9	5.9	5.6	5.6	5.6	4.9
^c F1	0	4.4	4.4	0	0	0	0	0	0	3.7
^c F2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
^d F3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
^e Colgate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^aBiofilm formation: reference free growth; ^bC1 and C2: antifungal free controls; ^cF1 and F2: C₁₆MImCl containing formulations; ^dF3: Cetylpyridinium Chloride

containing formulation; ^eColgate: Colgate PLAX FRESHMINT[®].

Figures:

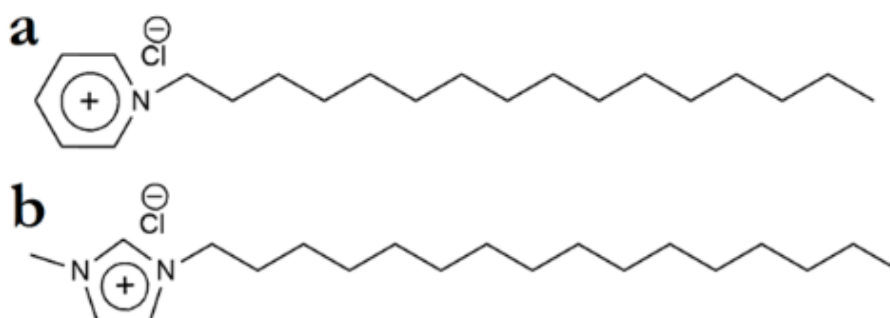


Figure 1. The chemical structure of (a) 1-*n*-hexadecylpyridinium chloride and (b) 1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride.

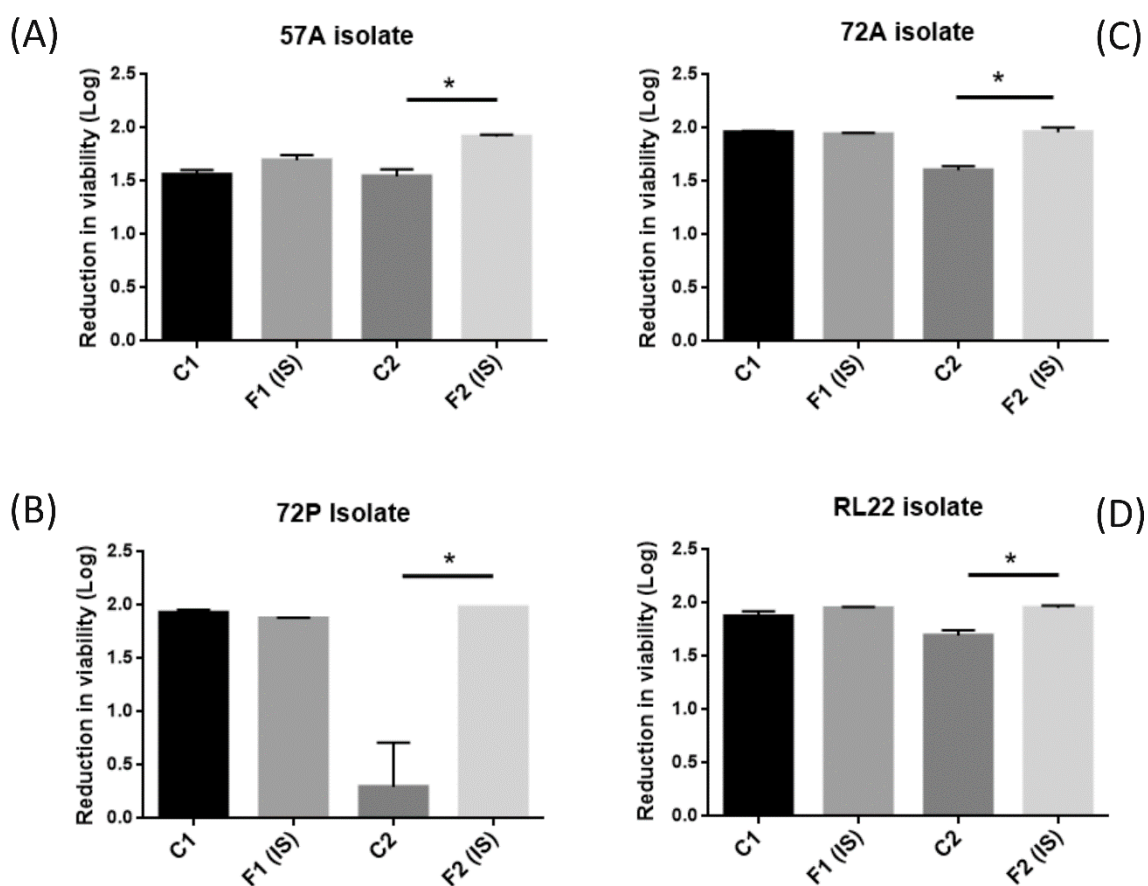


Figure 2. Antibiofilm activity of four *Candida* isolates; *C. tropicalis* 57A (A), *C.*

tropicalis 72P (B), *C. tropicalis* 72A (C), *C. glabrata* RL22 (D); based on the damage of F1 and F2 compared to their controls (C1 and C2, respectively). The samples marked with (*) are statistically different ($p < 0.05$).

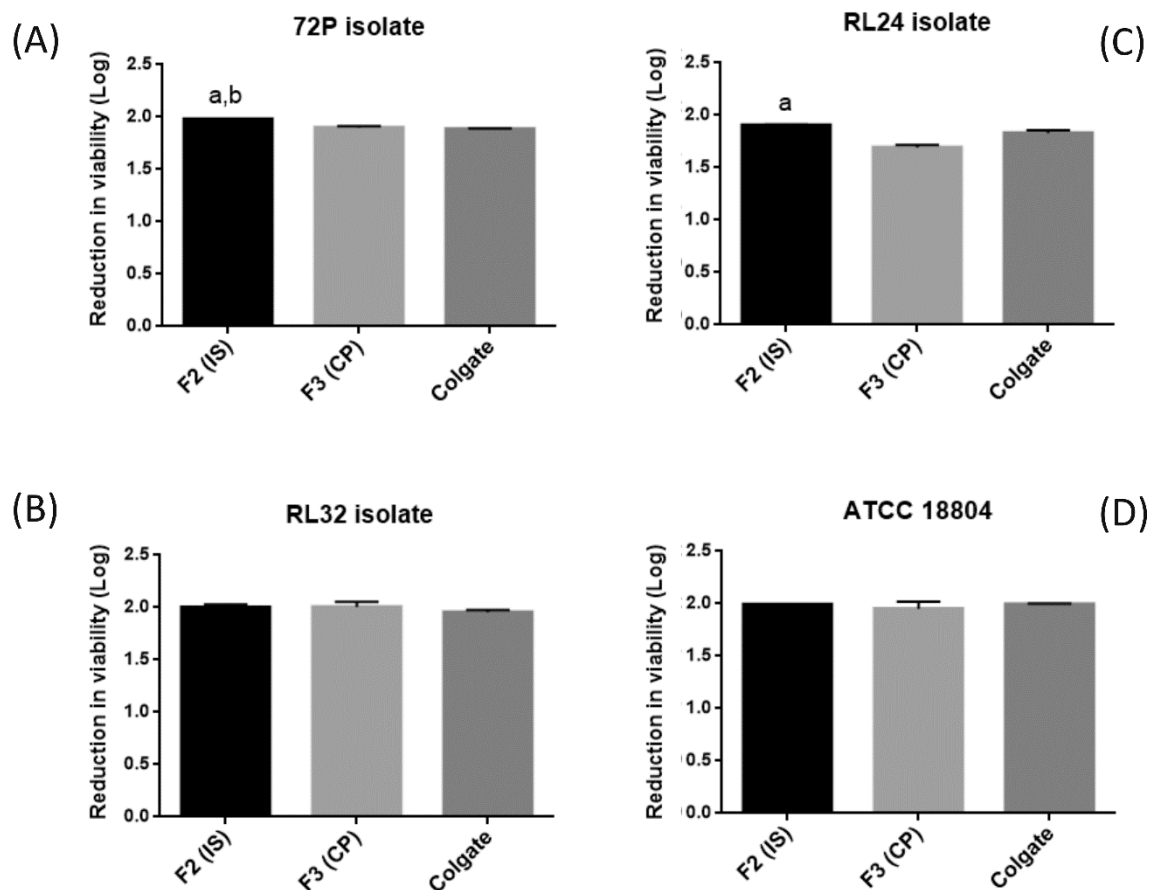


Figure 3. Antibiofilm activity of four *Candida* isolates; *C. tropicalis* 72P (A), *C. parapsilosis* RL32 (B), *C. glabrata* RL24 (C), and *C. albicans* ATCC18804[®] (D); based on the damage of F2 compared to F3 and the commercial formulation Colgate. The samples marked with (a) present activity statistically higher than F3 ($p < 0.05$); and (b) activity statistically higher than Colgate ($p < 0.05$).

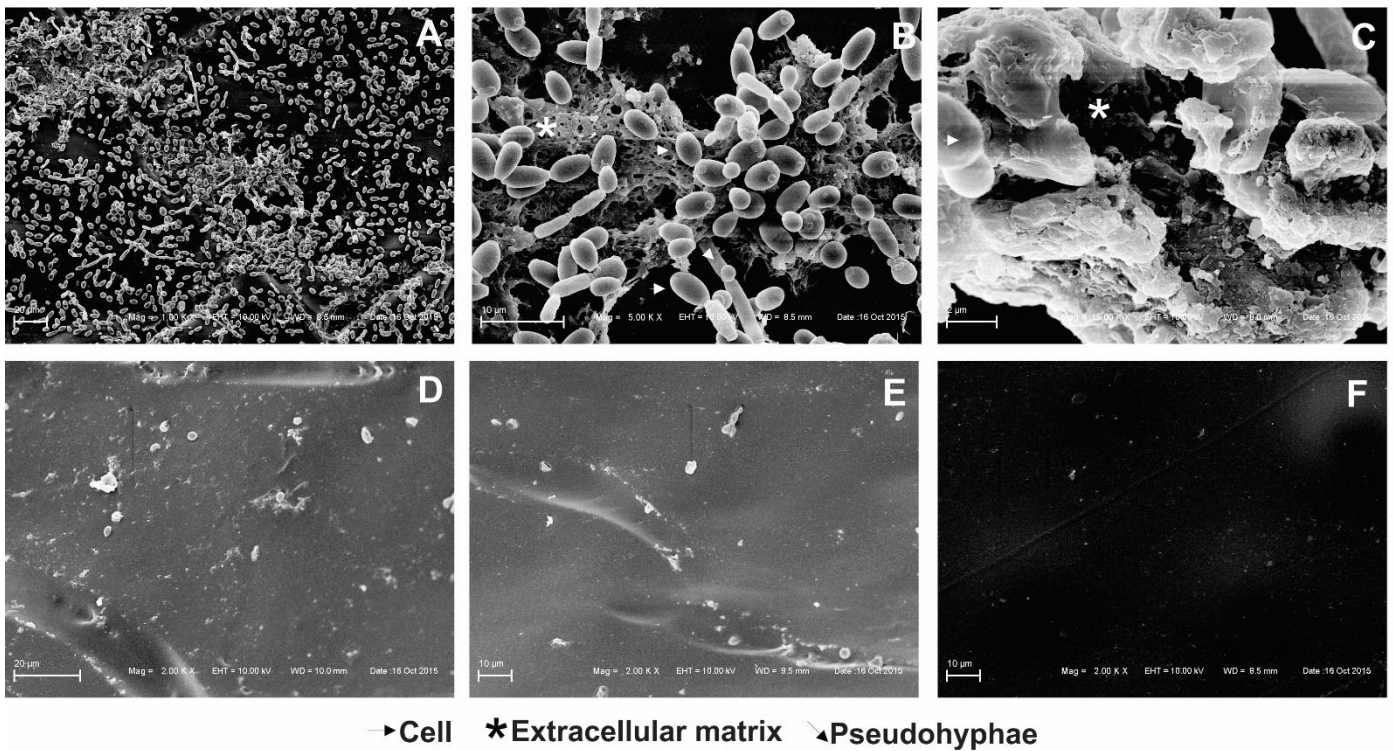


Figure 4. Scanning electron microscopy of *Candida tropicalis* morphotype following 24 h of incubation on acrylic resin showing a vast cell growth - Overview (a), cells within extracellular material forming a biofilm-like colony (b) cell embedded into the biofilm (c). Absence of cells after treatment of resin surface with F3 (d), C₁₆MImCl (e) and F2 (f).

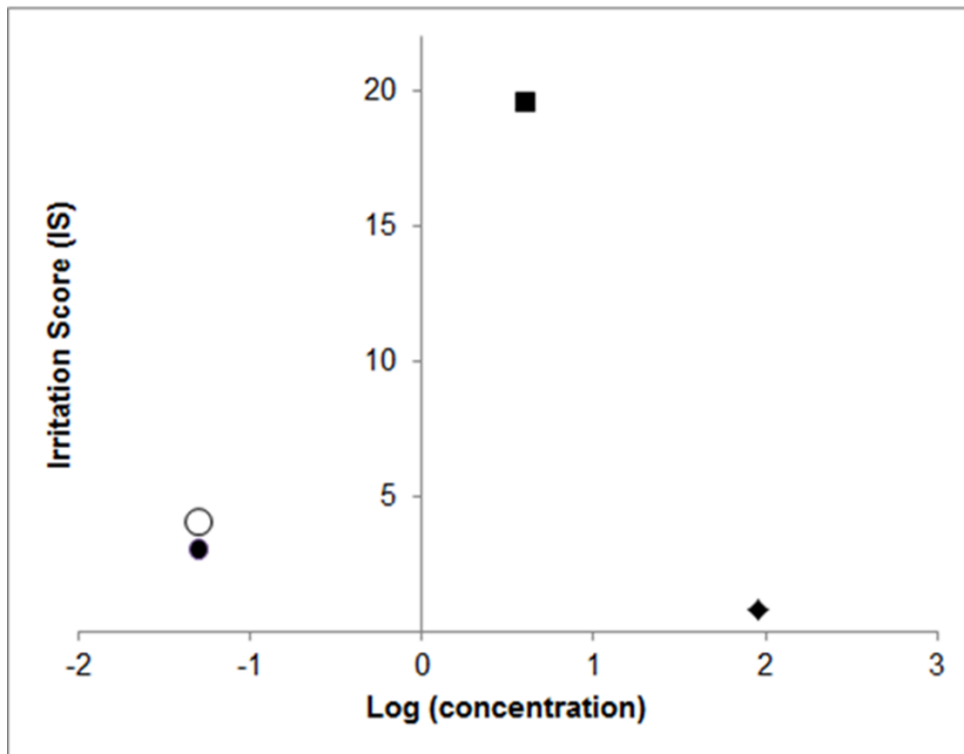


Figure 5. Dose-response relationship for the pure IMS and F2 (formulation vs. pure active substance); where IMS (○), F2 (●), negative control (0.9 % NaCl) (◆) and positive control (0.1 M NaOH) (■). Each point represent one experiment (n = three eggs).

5.2 Artigo 2

**Este artigo foi submetido na revista “Folia Microbiológica” QUALIS B2
(JCR 2016: 1,521).**

Evaluation of the effectiveness of allylic selenocyanates as oral antibiofilm agent against pathogenic and azole-resistant *Candida* spp. strains

Vanessa Z. Bergamo¹, Gustavo P. Silveira², Marcus M. Sá³, Rômulo F. S. Canto⁴, William Lopes⁵, Marilene H. Vainstein⁵, Mario L. Teixeira⁶, Marina C. Nemitz⁷, Bruna Pippi¹, Daiane F. Dalla Lana⁸, Saulo F. de Andrade⁸, Alexandre M. Fuentefria^{1,8}

¹ Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁴ Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁵ Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁶ Laboratório de Farmacologia, Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, Concórdia, Brazil

⁷ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, Brazil

⁸ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

(✉) Alexandre M. Fuentefria, PhD
alexandre.fuentefria@ufrgs.br

ABSTRACT

Infections in oral tissues due to continuous use of removable prosthesis, known as prosthetic stomatitis, are commonly associated to the genus *Candida*. This study aimed to evaluate the effect of allylic selenocyanates as an antibiofilm ingredient of mouthwash formulations against *Candida* spp. strains. The antibiofilm activity of the allylic selenocyanates was initially evaluated by the crystal violet assay using 96-well microplates. The concentration of allylic selenocyanates to completely *Candida* spp. biofilms (antibiofilm activity) were determined as 150 µg/ml. This concentration was used to prepare mouthwash formulations with antibiofilm activity over the surface of the acrylic resin strip. The results were quantified by log (CFU/cm²) and compared with the commercially available mouthwash formulation Listerine®. In addition, scanning electron microscopy images demonstrated that formulations containing allylic selenocyanates in the presence or absence of potassium sorbate destroys . The HET-CAM test, an *ex vivo* model, showed no irritant effect to the proposed formulations. Two of the allylic selenocyanates under study presented high potential to be used as mouthwash active agent (antibiofilm capacity), especially against pathogenic and resistant *Candida* spp. strains.

Keywords: biofilm; resistant *Candida* sp.; acrylic resin; allylic selenocyanates; mouthwash formulation.

Introduction

Infections in oral tissues due to continuous use of removable prosthesis are known as prosthetic stomatitis and are commonly associated to the genus *Candida* (Pellizzaro et al., 2012). This inflammation happens at the palatal mucosa in contact with the prosthesis surface and range from petechial to generalized irritation with papillary hyperplasia (Hahnel et al., 2012; Pellizzaro et al., 2012). Causes that may favor this disease are systemic disorders and lack of oral hygiene. Besides, prosthesis containing hydrophobic and roughness surfaces might contribute to the development of microorganisms resulting in biofilm formation (Wen et al., 2016).

Considering that prosthesis is in direct contact to the buccal mucosa and its natural microorganisms, the biofilm formed on these surfaces has similar complexity and microbial variety to the underlying mucosa (Brusca et al., 2013). Although the genus *Candida*, especially *C. albicans*, is predominant and more pathogenic (Czerninski et al., 2015), other species such as *C. tropicalis* and *C. glabrata* could be found in these biofilms (West et al., 2004; He et al., 2006; de Freitas Fernandes et al., 2011; Gomes et al., 2011; Czerninski et al., 2015).

The topical and the systemic antifungal agents are common drugs used for treating stomatitis. However, the prosthetic stomatitis is in general more complex to treat than other superficial fungal infections (Dhir et al., 2007) due to the resistance of *Candida* spp. in biofilm to the azo-antifungals (Perezous et al., 2005). Fungal biofilms have been reported to be up to 1000-fold more resistant to antifungal agents than planktonic cells (Ramage et al., 2012). Hence, it is necessary to identify new compounds that possess antibiofilm properties and are capable of biofilm formation at the prosthesis surface. Allylic thiocyanates (Ferreira et al., 2009; Basavaiah et al., 2010) have shown significant biological activity as antitumor (Cisilotto et al., 2015), antitubercular (Silveira et al., 2012), and antimicrobial agents (Sá et al., 2014).

Similarly, recent results from our research group demonstrated that allylic selenocyanates, the selenium isostere of the allylic thiocyanates, present high antifungal properties against several *Candida* spp. and dermatophytes

strains (Silveira et al., 2017) with low irritant score by the HET-CAM test (ICCVMA, 2010). Thus, these results encourage us to develop a mouthwash formulation containing an allylic selenocyanates capable of oral *Candida* in biofilms on acrylic resin prostheses.

Materials and methods

Microbial strains

Strains of *C. tropicalis* (72A) and *C. glabrata* (RL22), deposited on the library of the Applied Mycology Laboratory at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS - Brazil), plus one commercial *C. albicans* strain (ATCC18804) were used in this study. The strain 72A is resistant to Fluconazole (Cristália[®], Itapira, Brazil), Amphotericin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Voriconazole (Sigma), and Anidulafungin (Pfizer[®]). The strain RL22 is resistant to Fluconazole (Cristália[®]), Itraconazole (Cristália[®]), Ketoconazole (Cristália[®]), and Miconazole (Cristália[®]). The ATCC18804 is resistant to Itraconazole (Cristália[®]) and Miconazole (Cristália[®]).

Synthesis of allylic selenocyanates

The allylic selenocyanates **1-3** (Fig. 1) were prepared by the reaction of the corresponding allylic bromide with potassium selenocyanate in aqueous acetone as previously described (Silveira et al., 2017).

Figure 1

Compounds **1-3** (obtained in chemical yields of 82-90%) were solved in DMSO to prepare 10 mg/ml stock solutions. Then, they were subsequently diluted to 150 µg/ml in the mouthwash formulation solution in a way that the final DMSO concentration was 1.5%.

Mouthwash formulations

Three formulations (F1, F2, and F3) of allylic selenocyanates **1-3** were prepared based on the National Formulary of Brazilian Pharmacopea (2012) and Bergamo et al. (2016), in which the mouthwash formulations contained the active substance (0.015% of **1-3** solved in DMSO), flavouring (0.3% peppermint hydroethanolic essence - Delaware, Porto Alegre, Brazil), edulcorant (0.05% sodium saccharin - Dinamica, São Paulo, Brazil), pH corrector (0.05% lactic acid - Dinamica, São Paulo, Brazil), preservation agent (0.1% potassium sorbate - Dinamica, São Paulo, Brazil), and water (*quantité suffisante pour* – qsp for 100 ml). Besides, three formulations (F1*, F2*, and F3*) were prepared with the same components but potassium sorbate. In addition, one formulation was prepared solely with the adjuvants (FA) in the same proportion as described to F, and another one with the adjuvants without potassium sorbate (FA*). Finally, one formulation was prepared with the adjuvants plus 2% DMSO (FAD) while another formulation contained the adjuvants and DMSO but no potassium sorbate (FAD*). Table 1 summarizes each of the formulations described above. Listerine® (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil, lot no. 0895B24) was used as positive control to antibiofilm activity. Active ingredients: eucalyptol (0.092% v/v), thymol (0.064% v/v), methyl salicylate (0.060% v/v), and menthol (0.042% v/v). Inactive ingredients: water, alcohol (21.6%), sorbitol solution, flavoring, poloxamer 407, benzoic acid, sodium saccharin, and sodium benzoate).

Table 1

Biofilm formation assay

Biofilm formation identification was performed using a microtitre plate of 96 wells as described by Bergamo et al. (2015) and Stepanovic et al. (2007), in triplicate, with modifications. Fungi strains were grown in Sabouraud agar for 24 h at 35 °C. 20 µl of each fungal solution containing 10⁶ CFU/ml were transferred to microtitre plates and supplemented with 180 µl of tryptone soy broth

(TSB). After incubation for 48 h at 35 °C, sterile distilled water was added to each well to remove loose cells. Then, 150 µl of methanol was poured into each well and the solvent removed. The microtitre plates were stained for 15 min with 150 µl of crystal violet (0.5%), at room temperature, and then cleaned with water. The adsorbed biofilm was re-suspended in 150 µl of ethanol and the absorption (A) measured using a spectrophotometer ($\lambda = 450$ nm) after 30 min. The biofilm formation was classified. Strong biofilm producer, A: > 0.280; average biofilm producer, A: 0.170–0.279; weak biofilm producer, A: 0.070–0.170; no biofilm producer, A: < 0.070. Values were determined in triplicate.

Antibiofilm activity assay

The allylic selenocyanates **1-3** were added into the microplates at 37.5, 75, and 150 µg/ml and left for 48 h at 0-10 °C. Next, the solution of each sample was removed from the microplate. Then, 20 µl of the freshly prepared inoculum at 10^6 CFU/ml was transferred to the microplates and supplemented with 180 µl of TSB. After incubation for 48 h at 35 °C, the culture was removed with the multichannel pipette without touching the walls. Then, distilled water was poured at each sterile well to rinse the loosely cells. Next, 150 µl of methanol was added for 20 min, inverted, allowed to dry for 30 min, and stained with 150 µl of 0.5% crystal violet for 15 min at room temperature. Subsequently, the excess of crystal violet was pipetted with a multichannel pipette, without touching the tips in the wells, and washed in running water until no more dye was observed. The dye was suspended with 150 µl of ethanol and allowed to stand for 30 min. The rate of adhesion of the fungal agent was verified by measuring the absorbance by readings using a spectrophotometer ($\lambda = 450$ nm) and the results quantified. The values were determined in triplicate.

Biofilm formation assay on acrylic resin

This assay was based on a previously published method by Bergamo et al. (2016). Pre-sterile pieces of acrylic resin (1 cm²) were prepared for the

biofilm formation test. The acrylic resins were kept in 9 mL of peptone water containing 1 ml of the fungal inoculum (10^6 CFU/ml) for 24 h at 32 °C. Then, they were washed with peptone water to remove loose cells. Resins were transferred to another bottle containing 5 ml of water and sonicated to release the biofilm cells. Finally, a dilution was performed (10^{-1} , 10^{-2} , and 10^{-3}) and 20 μ l aliquot of each dilution was plated on Sabouraud agar by the drop method. The microtiter plates were incubated for 24 h at 32 °C to count the colonies and the CFU/cm² values determined in triplicate.

Antibiofilm activity evaluation on acrylic resin strips

The antibiofilm activity was evaluated using sterile acrylic resins (1 cm²). These resins were immersed into the formulations F1-F3, F1-F3*, FA, FA*, FAD, FAD*, and Listerine[®] for 1 min. Then, they were dried in open air (2 min) and immersed in 9 mL of peptone water containing 1 mL of inoculum (10^6 CFU/ml) for 24 h at 32 °C. After incubation, the inoculated acrylic resin strips were washed 3 times with peptone water for removing loosely cells. The washed samples were sonicated for 10 min with 5 ml of peptone water to collect the biofilm for quantification. Decimal dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , and 10^{-3}) were made and a 20 μ l aliquot of each dilution was plated on Sabouraud agar by the drop method. The microtiter plates were incubated at 32 °C for 24 h and the colonies formed were counted in triplicate.

Scanning electron microscopy (SEM) analysis of the biofilm of *Candida tropicalis* in acrylic resin

The acrylic resin used in the biofilm inhibition test were transferred to another microtiter plate containing 2.5% glutaraldehyde (Merck) in 0.1 M cacodylate buffer (Sigma-Aldrich) and incubated at room temperature for 5 min. The samples were serially dehydrated in ethanol (10, 35, 45, 90, and 100%) and dried in a critical-point dryer using liquid CO₂. The samples were coated with gold and were observed on an EVO-50HV Carl Zeiss scanning electron microscope.

Hypoallergenicity evaluation

Fresh and white fertile eggs were used for HET-CAM (Lohmann selected Leghorn, LSL). Eggs were kept under optimized incubation conditions (temperature 38–39 °C and humidity 55–60%) for ten days. On the tenth day, the egg shell, around the airspace, was carefully removed with a rotary tool (Dremel, WI). 0.3 ml of each sample (F1–F3, F1–F3*, FA, FA*, FAD, FAD*, negative control - 0.9% saline solution, and positive control - 0.1 M NaOH solution) was added into the open egg. Irritant effect was observed 30, 120, and 300 seconds after sample application. Irritation score (IS) was determined by the equation (1) as follow: 0–4.9 - nonirritant (or practically no irritation); 5.0–21 - irritant (moderate/severe or extreme irritation) (ICCVMA, 2010).

$$IS = \left(\left(\frac{(301 - Hemorrhage\ Time)}{300} \right)^{x5} \right) + \left(\left(\frac{(301 - Lysis\ Time)}{300} \right)^{x7} \right) + \left(\left(\frac{(301 - Coagulation\ Time)}{300} \right)^{x9} \right)$$

Hemorrhage time, *Lysis time* and *Coagulation time* are the time (in seconds) of the first appearance of blood hemorrhages, vessel lysis, and protein coagulation, respectively.

Results

Biofilm formation assay in 96 wells microtitre plate

C. tropicalis 72A and *C. glabrata* RL22 strains produced biofilms in the microplate wells classified as medium, strong or weak for the 72A strain and strong or weak for the RL22 strain, after 48 h at 35 °C. The *C. albicans* ATCC18804 strain formed weak biofilms during the same period and temperature (Table 2 – control).

Antibiofilm activity assay in 96 wells microtitre plate

The concentrations tested to the allylic selenocyanates **1-3** ranged from 37.5 to 150 µg/ml (Table 2).

Table 2

Selenocyanates **1** and **2** (150 µg/ml) partially inhibited the growth of *C. tropicalis* biofilm from medium to weak and strong to medium, respectively (Table 2, entries 1 and 4). Meanwhile, selenocyanate **3** inhibited completely the 72A biofilm formation at the same concentration (Table 2, entry 7).

In the presence of *Candida glabrata*, the selenocyanate **2** was not able to modify the phenotypic profile of the biofilm in the concentration of 150 µg/ml. However, **1** decreased the RL22 biofilm from strong to weak (Table 2, entries 1-3), and **3** inhibited its biofilm formation with 150 and 75 µg/ml (Table 2, entries 7 and 8).

No significant differences were observed in the weak biofilm formation of *C. albicans* in the presence of the allylic selenocyanate **1** against the concentrations screened. However, selenocyanates **2** and **3** inhibited completely its biofilm formation at 150 µg/ml (Table 2, entries 4 and 7).

Biofilm formation assay and antibiofilm activity evaluation on acrylic resin strips

C. tropicalis (72A), *C. glabrata* (RL22), and *C. albicans* (ATCC18804) were capable of forming biofilms (Table 3 - BF) over the acrylic resin strips surface (CFU/cm²). 72A and RL22 strains produced larger biofilms (5.9) than ATCC18804 strain (5.3).

Concerning the biofilm inhibition, the controls FA and FA* presented log (CFU cm²) values of 5.1–5.3 and 5.3–5.7, respectively (Table 3, entries 7 and 8), whereas FAD presented values of 5.3–5.5 and FAD*, 5.3–5.5 (Table 3, entries 9 and 10). In the presence of allylic selenocyanates **1-3**, the 72A strain produced the highest biofilm inhibition, while RL22 and ATCC18804 strains generated the

lowest values. Antibiofilm activity of the formulations F1, F1*, F3, and F3* were 0.0 for *C. tropicalis* (Table 3, entries 1, 2, 5, and 6), Table 3, entry 12). Furthermore, antibiofilm activities of F2* and F3 were, respectively, 4.5 and 4.9 for *C. glabrata*, Table 3, entry 12). For the ATCC18804 strain, however, the antibiofilm activity of F1 and F3 were the same (4.5) and very close to the value of Listerine® (Table 3, entries 1, 5, and 12, respectively).

Table 3

SEM analysis of the biofilm of *Candida tropicalis* over acrylic resin

SEM was used for the ultrastructural analysis of *C. tropicalis* (72A) on the surface of the acrylic resin. Untreated acrylic resin (Fig 2a-e) presented extracellular material formation and various biofilm colonies. These biofilms consisted of a network entangled by yeast cells and hyphae deeply embedded inside imperfections, cracks, and porosity of the specimen. A large biofilm reduction was observed after the treatment with formulations containing allylic selenocyanates in the presence or absence of potassium sorbate (Fig. 2g-m). In addition, the acrylic resin exposed to F1 (Fig. 2f), F1* (Fig. 2g), F3 (Fig. 2j), and F3*(Fig. 2l) had its biofilm and exopolymeric matrix inhibited. Thus, these formulations present efficacy compared to the results obtained for Listerine® (Fig. 2m).

Figure 2

Hypoallergenicity evaluation

The hypoallergenicity test using fresh and white fertile eggs to the mouthwash formulations F1–F3, F1–F3* (selenocyanates at 150 µg/ml) gave ISs ranging from 2.58 to 4.87, which classify them as non-irritant.

Discussion

The biofilm formation on the surface of the dental prosthesis acts in the development of prosthetic stomatitis, promoting the pathogenicity of *Candida* species in the oral mucosa. This infection may cause an oral disease justifying the use of antimicrobials to control the fast microbial growth. However, the resistance to the traditional antifungal agents arise in the long term or in the prophylactic approach to immunosuppressed patients (Goldman 2004; Wingeter et al., 2007; Lewis 2011; Lazarin et al., 2014).

Allylic selenocyanates **1-3** showed an expressive antibiofilm activity as supported by the crystal violet method (150 µg/ml, Table 2), enabling us to develop six mouthwash formulations containing 150 µg/ml (0.015%) of these compounds as the active ingredient. Besides, preliminary data from our group shown that allylic selenocyanates presented antifungal activity against *Candida* spp. and filamentous fungi as well as several clinical *Fusarium* spp. strains (Silveira et al., 2017).

The choice of the components to prepare all mouthwash formulations was based on previous study Bergamo et al. (2016). In the present investigation, it was necessary to evaluate if potassium sorbate presents antifungal activity since its preservative properties are also known (Silapasorn et al., 2011). Thus, the results obtained for F1-F3 were compared with F1-F3* which corresponds to formulations without potassium sorbate. These results were also correlated with formulation controls prepared with adjuvants excluding compounds **1-3** (FA), as well as with adjuvants minus sodium sorbate (FA*).

Data obtained for the formulations containing the active principles **1-3** compared to the controls (FA and FA*), in the plaque count (CFU/cm²) indicated that F1, F1*, F3, and F3* exhibited the same level of fungal antibiofilm activity to *C. tropicalis*. Hence, to formulation 1 and 3, it is clear that sodium sorbate does not display any antifungal and/or antibiofilm activity. As expected, the absence of **1-3** at the controls FA and FA* did not result in formulations with antibiofilm properties (Table 3).

Listerine® has the ability to reduce the viability of the *Candida* spp.

biofilm (Meiller et al., 2001; Lamfon et al., 2004; Cortelli et al., 2012). Besides, Listerine® presents superior efficacy against pathogenic fungi compared to Antiseptic, Tartar, and Peridex mouthrinses, as well as 0.2% chlorhexidine digluconate solution (Meiller et al., 2001). Therefore, antibiofilm activities of the developed formulations were compared to Listerine® (positive control) (Table 3). The total biofilm inhibition over acrylic resins in the presence of the formulations F1-F3 and formulations lacking potassium sorbate F1-F3* were better than the biofilm inhibition caused by Listerine®. Noteworthy, the formulations were developed with a single active principle (allylic selenocyanates **1-3**) in lesser concentration (0.015%) than the four active principles present in the Listerine® formula (Ramage et al., 2011; Fu et al., 2014), which is very attractive in terms of chemical process.

The presence of DMSO on the developed formulations was evaluated (FAD and FAD*). The log (CFU/cm²) assay indicates that there is no interference of DMSO to the antibiofilm activities of F1-F3 (1.5% DMSO). According to literature, up to 2% of DMSO at formulations does not influence fungal growth (Rodríguez-Tudela et al., 2001). Thus, it is possible to affirm that the antibiofilm capacity observed is caused by selenocyanates **1-3** as the active principle.

Fungal can adhere to surfaces forming biofilms as a consequence of polymeric extracellular matrix production which encases cells (Nett and Andes, 2017). After 24 h in the presence of inoculum, biofilm was developed over acrylic resin and its structure observed by SEM. It was noted that *C. tropicalis* biofilms formed an entangled network of yeast cells and hyphae deeply embedded inside imperfections, cracks, and pores of the specimen (Fig. 2 a–e).

However, when the resins were treated with formulations containing **1-3**, extracellular matrix was rarely observed, an essential factor demonstrating that these compounds were able to destroy the major core of the biofilm (Fig. 2f-m).

The HET-CAM is a semi-quantitative toxicity assay to measure the irritancy level of molecules which uses the chicken embryo egg-choroidal membrane. According to ICCVMA (2010), this *ex vivo* method determines the allergenic potential of cosmetic products at the mucosal level. This assay was also conducted to check the allergic potential of the selenocyanates **1-3** (50

µg/ml) (Silveira et al., 2017) and **1-3** as active principle of the formulations F1-F3 (150 µg/ml). These results clearly demonstrated that compounds **1-3**, as the active principles of F1-F3, are non-irritating of the embryonic mucosa.

Conclusion

Finally, results obtained for biofilm formation from the crystal violet assay and the CFU/cm² method corroborate. *Candida glabrata* and *C. tropicalis* presented higher capacity to produce biofilm than *C. albicans*. Formulations containing allylic selenocyanates **1-3** present antibiofilm activity against *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* strains at 150 µg/ml. The best results were obtained for formulations F1, F1*, F3, and F3*. Therefore, it is suggested that the allylic selenocyanates **1** and **3** are strong candidates to be used as active principles for mouthwash formulations against biofilm of *Candida* spp.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Center of Microscopy and Microanalysis-UFRGS for the SEM and the Brazilian agencies CAPES, CNPq, and FAPERGS (Edital PRONUPEQ 2016) for the financial support. A. M. Fuentefria, M. M. Sá, and M. H. Vainstein are grateful to CNPq for the PQ fellowships.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests

References

Basavaiah D, Reddy BS, Badsara, SS (2010) Recent contributions from the Baylis-Hillman reaction to organic chemistry. *Chem Rev* 110:5447-5674.

Bergamo VZ, Donato RK, Dalla Lana DF, Donato KJZ, Ortega GG, Schrekker HS, Fuentefria AM (2015) Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* strains. *Lett Appl Microbiol* 60: 66-71.

Bergamo VZ, Donato RK, Nemitz MC, Acasigua GA, Selukar BS, Lopes W, Dalla Lana DF, Teixeira ML, Teixeira HF, Schrekker HS, Fuentefria AM (2016) Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation. *J Appl Microbiol* 121:1558-1567.

Brusca MI, Irastorza RM, Cattoni DI, Ozu M, Chara O (2013) Mechanisms of interaction between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: An experimental and mathematical modelling study. *Acta Odontol Scand* 71:416-23.

Cisilotto J, Ferreira M, Filippin-Monteiro FB, Bortoluzzi AJ, Sá MM, Creczynski-Pasa TB (2015) Isothiuronium Salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. *Anticancer Agents Med Chem* 15:353-362.

Cortelli SC, Cortelli JR, Wu MM, Simmons K, Charles CA (2012) Comparative antiplaque and antigingivitis efficacy of a multipurpose essential oil-containing mouthrinse and a cetylpyridinium chloride-containing mouthrinse: A 6-month randomized clinical trial. *Quintessence Int* 43 (2012) e82-94.

Czerninski R, Pikovsky A, Gati I, Friedman M, Steinberg D (2015) Comparison of the efficacy of a novel sustained release clotrimazole varnish and clotrimazole troches for the treatment of oral candidiasis. *Clin Oral Investig* 19:467-73.

de Freitas Fernandes FS, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Filho AP, Straioto FG, Del Bel Cury AA (2011) Efficacy of denture cleansers on *Candida spp.* biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *J Prosthet Dent* 105:51-8.

Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Dentino, A. (2007) Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. *J Prosthodont* 16:465-72.

Ferreira M, Fernandes L, Sá MM (2009) A highly efficient and general method for the preparation of (*Z*)-allylic bromides derived from Morita-Baylis-Hillman adducts. *J Braz Chem Soc* 564:568-20.

Fu J, Wei P, Zhao C, He C, Yan Z, Hua H (2014) *In vitro* antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes. *Oral Dis* 20:815–820

Goldman GH (2004) Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical strains from HIV-infected patients in Brazil. *Diag Microb and Infectious Disease* 50:25-32.

Gomes PN, da Silva WJ, Pousa CC, Narvaes, EA, Del Bel Cury AA (2011) Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. *Arch Oral Biol* 56:1274-81.

Hahnel S, Rosentritt M, Bürgers R, Handel G, Lang R (2012) *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology* 29:383-91.

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

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVMA) (2010) The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Research Triangle Park: National Toxicology Program.

Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J (2004) Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermenter to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother* 53:383–385.

Lazarin AA, Zamperini CA, Vergani CE, Wady AF, Giampaolo ET, Machado AL (2014) *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an *in vitro* study. *Gerodontology* 31:25-

33.

Lewis RE (2011) Current Concepts in Antifungal Pharmacology. Mayo Clin Proc 86:805–817.

Meiller TF, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, Depaola LG, Baqui AA, Falkler WA (2001) *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 91:663-70.

National Formulary of Brazilian Pharmacopea (2012) Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: Anvisa.

Nett JE, Andes A (2017) The Role of Biofilm Matrix in Mediating Antifungal Resistance. Handbook of Antimicrobial Resistance. Part IV: pp 369-384.

Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani, CE (2012) Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing *in vitro* *Candida albicans* biofilm viability. Braz Dent J 23:547-54.

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

Ramage G, Jose A, Coco B, Rajendran R, Rautemaa R, Murray C, Lappin DF, Bagg J (2011) Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms *in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 111:456-60.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C, Fungal biofilm resistance. Int J Microbiol. 2012:528521. [https://doi: 10.1155/2012/528521](https://doi.org/10.1155/2012/528521). Epub 2012 Feb 8.

Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E (2001) Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. J Clin Microbiol 39:2513-7.

Sá MM, Ferreira M, Lima ES, Santos I, Orlandi PP, Fernandes L (2014) Antimicrobial activity of allylic thiocyanates derived from the Morita-Baylis-Hillman reaction. Braz J Microbiol 45:807:812.

Silveira GP, Ferreira M, Fernandes L, Moraski GC, Cho S, Hwang C,

Franzblau SG, Sá MM (2012) Allylic thiocyanates as a new class of antitubercular agents. *Bioorg Med Chem Lett* 22:6486-6489.

Silveira GP, Andrade SF, Batista BG, Fuentefria AM, Braga AL, Canto RF, Barbosa FR, Ferreira M, Russo TV, Sá MM (2017) Selenocianato alílico, processo de obtenção e usos do mesmo e composição de enxaguatório bucal. Br Patent 1020170151840.

Silapasorn K, Sombatsompop K, Kositchaiyong A, Wimolmala E, Markpin T, Sombatsompop N (2011) Effect of chemical structure of thermoplastics on antibacterial activity and physical diffusion of triclosan doped in vinyl thermoplastics and their composites with CaCO₃, *J Appl Polym Sci* 121:253-261.

Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka FV (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 8:891–899.

Wen J, Jiang F, Yeh C, Sun Y (2016) Controlling fungal biofilms with functional drug delivery denture biomaterials. *Colloids Surf B* 140:19–27.

West SL, Salvage JP, Lobb EJ, Armes SP, Billingham NC, Lewis AL, Hanlon GW, Lloyd AW (2004) The biocompatibility of crosslinkable copolymer coatings containing sulfobetaines and phosphobetaines. *Biomaterials* 25:1195-204.

Wingeter MA, Guilhemertti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE (2007) Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:272-6.

Tables:**Table 1** Components and proportions to prepare the mouthwash formulations.

Formulation	F1–F3	(F1–F3)*	FA	FA*	FAD	FAD*
Sodium saccharin	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Potassium sorbate	0.1	-	0.1	-	0.1	-
Peppermint essence	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Lactic acid	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
1, 2 or 3	0.015	0.015	-	-	-	-
DMSO	1.5	1.5	-	-	2	2
Water	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.

All numbers are expressed in percentage. *Without potassium sorbate.
FA: formulation with adjuvants. FAD: formulation with adjuvants and DMSO.

Table 2 Biofilm of *C. tropicalis*, *glabrata*, and *albicans* in the presence of three concentrations of **1-3** after 48 h at 35 °C.

Entry	Compound	Concentration (µg/ml)	Strain (compound/control)					
			<i>C. tropicalis</i> 72A		<i>C. glabrata</i> RL22		<i>C. albicans</i> ATCC18804	
			control	compound	Control	compound	control	compound
1		150	M	W	S	W	W	W
2	1	75	M	M	S	W	W	W
3		37.5	M	M	S	W	W	W
4		150	S	M	W	W	W	NBP
5	2	75	S	S	W	W	W	W
6		37.5	S	S	W	W	W	W
7		150	W	N	W	NBP	W	NBP
8	3	75	W	W	W	NBP	W	W
9		37.5	W	W	W	W	W	W

S: strong biofilm formation. M: medium biofilm formation. W: weak biofilm formation. NBP: no biofilm formation. Control: biofilm formed without treatment with selenocyanates **1-3**.

Table 3 Antibiofilm activity of the formulations against *C. tropicalis*, *glabrata*, and *albicans*.

Antibiofilm activity [log (CFU/cm²)]

Entry	Formulation	Fungi strain		
		<i>C. tropicalis</i> 72A	<i>C. glabrata</i> RL22	<i>C. albicans</i> ATCC18804
1	F1	0	5.2	4.5
2	F1*	0	5.4	5.3
3	F2	5.7	5.7	5.0
4	F2*	5.0	4.5	5.2
5	F3	0	4.9	4.5
6	F3*	0	5.3	4.3
7	FA	5.1	5.3	5.3
8	FA*	5.3	5.7	5.4
9	FAD	5.5	5.5	5.3
10	FAD*	5.5	5.5	5.3
11	^a BF	5.9	5.9	5.3
12	Listerine [®]	4.7	5.2	4.6

^aBiofilm formation (BF) *without potassium sorbate. FA: formulation with adjuvants. FAD: formulation with adjuvants and 2% DMSO. [Allylic selenocyanates 1-3]: 150 µg/ml (0.015%). Listerine[®]: (positive control).

Figures:

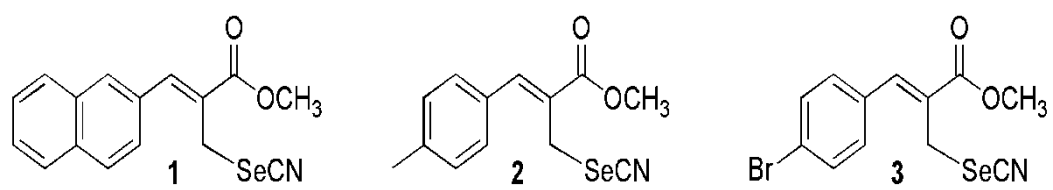


Fig. 1 Allylic selenocyanates **1-3**

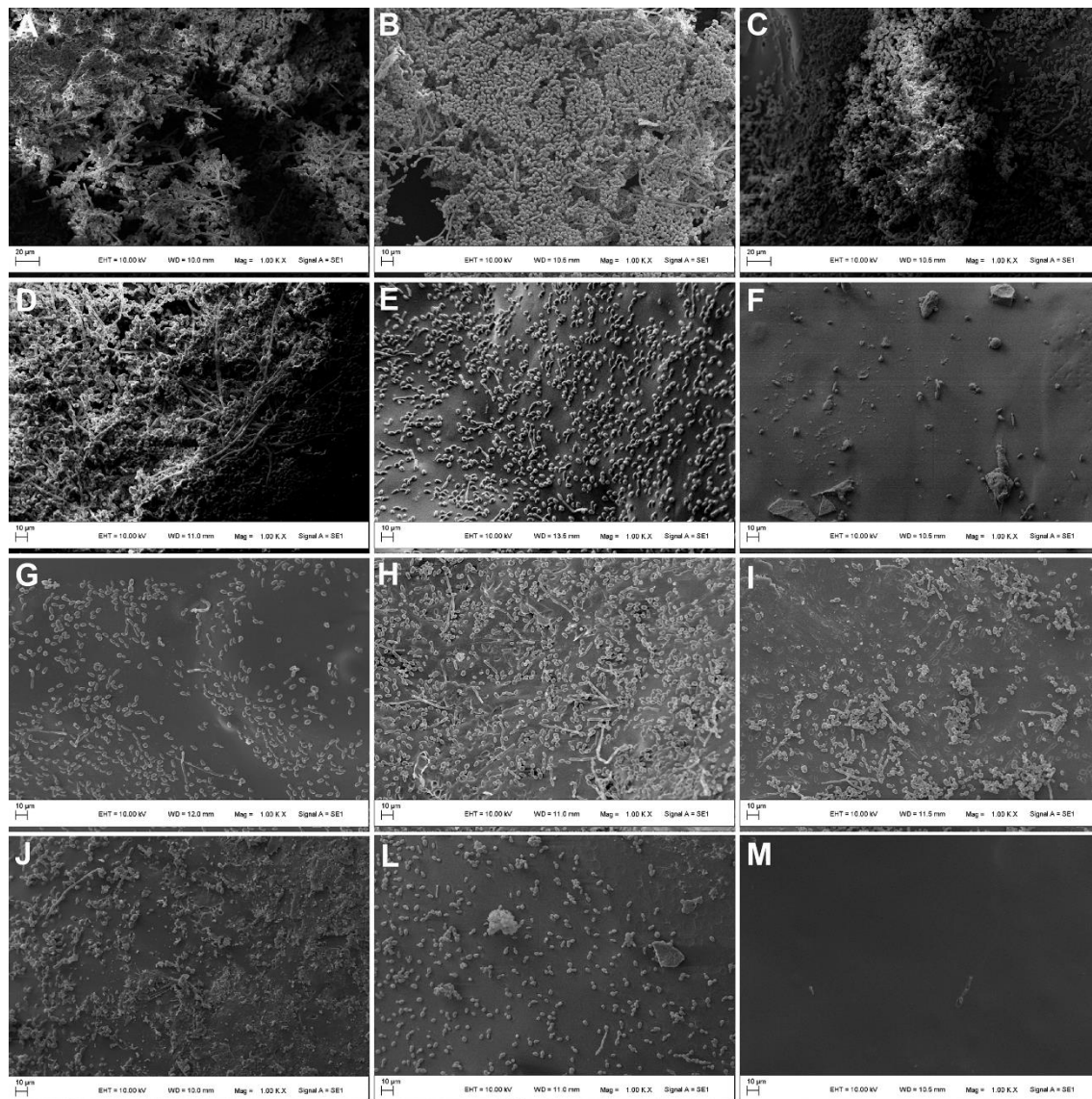


Fig. 2 SEMs of *C. tropicalis*: a (Surface untreated), b (FA), c (FA*), d (FAD), e (FAD*), f (F1), g (F1*), h (F2), i (F2*), j (F3), l (F3*), and m (Listerine®) (Original magnification x---)

5.3 Artigo 3

Este artigo de revisão foi submetido na revista “Clinical & Biomedical Research”. QUALIS B5.

**Novas tendências de combate ao biofilme de *Candida* em
próteses dentárias**

New trends to combat *Candida* biofilm in dental prosthetics

**Vanessa Zafaneli Bergamo¹, Daiane Flores Dalla Lana², Bruna
Pippi¹, Irene Clemes Kulkamp Guerreiro², Alexandre Meneghello
Fuentefria^{1,2}**

¹ Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

² Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Autor correspondente: Vanessa Zafaneli Bergamo

bergamovanessa@hotmail.com

Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Av. Ipiranga, 2752

90610-000, Porto Alegre (RS), Brasil.

55 51 981816238.

RESUMO

Apesar da espécie *Candida albicans* ser efetivamente o microrganismo mais frequentemente associado a estomatite protética, as espécies de *Candida*-não-*albicans* (CNA) já foram isoladas das superfícies de dentaduras e da mucosa oral de indivíduos com essa lesão eritematosa. A virulência das espécies de *Candida* e a capacidade de adesão a polímeros acrílicos são condições prévias para a colonização e desenvolvimento de biofilmes em superfícies de dentaduras. Estudos recentes focam na tentativa de modificação das resinas acrílicas para diminuir a adesão de cepas patogênicas e formadoras de biofilme do gênero *Candida* spp.. Dentro desse aspecto, esta revisão sistematiza o atual panorama epidemiológico da estomatite protética associada ao uso de próteses dentárias, bem como as atuais e novas opções de combate do biofilme fúngico especializado na adesão deste tipo de biomaterial.

Palavras-chaves: *Candida* spp., biofilme, estomatite protética, resina acrílica, tratamento.

ABSTRACT

Although the species *Candida albicans* is effectively the microorganism most frequently associated with prosthetic stomatitis, the species of *Candida*-non-*albicans* (CNA) have already been isolated from the denture and oral mucosa surfaces of individuals with this erythematous lesion. The virulence of *Candida* species and the ability to adhesion to acrylic polymers are preconditions for the colonization and development of biofilms on denture surfaces. Recent studies focus on the attempt to modify the acrylic resins to reduce the adhesion

of pathogenic and biofilm forming strains of the genus *Candida* spp.. In this this aspect, this review systematizes the current epidemiological panorama of prosthetic stomatitis associated with the use of dental prostheses, and new options for combating the fungal biofilm specialized in the adhesion of this type of biomaterial.

Keywords: *Candida* spp., biofilm, prosthetic stomatitis, acrylic resin, treatment.

Introdução

Candida albicans é o agente etiológico mais prevalente de candidoses eritematosas crônicas, conhecidas como estomatite protética (EP). Essa lesão eritematosa é uma reação inflamatória da mucosa palatina e alveolar subjacente à dentadura removível. A EP é diagnosticada em 25 a 42% dos idosos portadores de próteses dentárias¹. Contudo, essa condição aumenta para mais de 76% quando o paciente usa o mesmo biomaterial por mais de dez anos¹. Esta enfermidade possui etiologia multifatorial onde a má higiene e o uso contínuo de próteses dentárias tem sido a causa mais frequentemente associada a essa doença².

Apesar de *C. albicans* ser o microrganismo mais recorrentemente associado a EP, as espécies de CNA já foram isoladas das superfícies de dentaduras de pacientes com essa enfermidade^{3,4}. As próteses dentárias proporcionam superfícies que facilitam a acumulação de biofilmes de placas ao longo do tempo. O biofilme de *Candida* spp. na resina acrílica se desenvolve através da adesão, que ocorre de forma direta na superfície condicionada ou

através de uma camada de placa de dentadura pré-existente⁵. Muitos fatores que afetam a adesão de *Candida* spp. foram descritos, entre eles, as interações hidrofóbicas e rugosidade da superfície do acrílico dos materiais protéticos⁶.

No que tange a virulência de *Candida*, a capacidade de adesão ao acrílico é uma condição prévia para a colonização e desenvolvimento de biofilmes em superfícies de dentaduras. Portanto, a inibição da adesão poderia ser eficaz para tratar ou prevenir a EP⁶. Alguns estudos focam na tentativa de modificação das resinas acrílicas para diminuir o fator de adesão de *Candida* spp.^{6,7}. A saber, vêm sendo utilizadas modificações químicas da carga superficial das resinas como recurso para retardar ou prevenir o efeito de adesão leveduriforme^{6,8,9}.

Esta revisão sistematiza o atual panorama epidemiológico da estomatite protética associada ao uso de próteses dentárias, bem como as atuais e novas opções de combate do biofilme fúngico especializado na adesão deste tipo de biomaterial.

Metodologia

Foi realizado um estudo de revisão bibliográfica sistemática a partir de bancos de dados e coleções da biblioteca virtual de saúde do National Institutes of Health (PubMed) e do Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES/MEC), no período de janeiro a outubro de 2017. A busca eletrônica foi realizada através dos termos “biofilme/biofilm”, “*Candida não-albicans/Candida non-albicans*”, “resina acrílica/acrylic resin”, tratamento/treatment”, “estomatite protética/stomatitis prosthetic”, epidemiologia/epidemiology”. Nesse contexto, a

revisão teve como abordagem os aspectos mais relevantes que contemplam a formação de biofilme fúngico quando relacionado à EP em pacientes que utilizam próteses dentárias, a terapêutica convencional e novos estudos que vêm sendo realizados para o tratamento dessa doença. Os critérios de inserção foram artigos originais e de revisão que se enquadrassem na temática estabelecida, publicados entre os anos de 2007-2017. Foram eliminados os estudos que não possuíam referências bibliográficas adequadas, incompletas ou com fontes terciárias. Dissertações, teses, monografias e livros não foram incluídos. Assim, 70 artigos atenderam a todos os critérios acima mencionados e foram detalhadamente analisados para agregar este estudo.

Estomatite protética

Devido ao aumento da longevidade, é cada vez maior a população senil em todo o mundo. No Brasil, o século XXI iniciou com o crescimento da população idosa quase oito vezes mais quando comparados aos jovens¹⁰. Os pacientes edêntulos necessitam de reabilitação protética, com próteses orientadas biologicamente que correspondam às necessidades reais do indivíduo, ocasionando o conforto e a mastigação adequada¹¹.

O paciente que utiliza prótese e que sofre de xerostomia tem risco maior de patologia oral e modificações da função oral devido à retenção não adequada da mesma¹¹. Integram-se a isso, queixas de halitose, ardência bucal e intolerância a sabores ácidos. A reabsorção óssea pode originar desadaptação na prótese, desgaste dos dentes nela incluídos e diminuir a altura da face¹¹. As próteses mandibulares, quando empregadas, tendem a estar mais

desadaptadas que as próteses maxilares¹².

O predomínio das lesões orais no adulto já foi evidenciado a nível mundial como na Colômbia, México, Brasil, Chile, Argentina, EUA, Israel, e em outros países asiáticos¹³. Em um estudo realizado na Venezuela, 340 pacientes foram avaliados clinicamente e, destes, 50% apresentaram uma ou mais lesões orais, principalmente associadas ao uso de prótese dentária. As lesões foram mais frequentemente observadas nos grupos de pessoas entre 60 a 74 anos e a alteração mais observada foi a estomatite protética (EP)¹³.

A candidíase oral, também conhecida por estomatite cremosa ou popularmente por “sapinho” trata-se de um processo infeccioso ocasionado pelos fungos do gênero *Candida*. Parte das manifestações da enfermidade varia de acordo com a região acometida pela infecção que pode ser: mucocutânea (entra em contato com a mucosa oral e vaginal), cutânea e sistêmica. Pode ser causada por diferentes espécies do gênero, tais como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*¹⁴. Nos pacientes que utilizam próteses, é denominada estomatite protética (EP), candidíase atrófica ou estomatite por prótese².

A EP é uma doença crônica associada com o uso de próteses dentárias que pode ser evidenciada por uma inflamação localizada ou generalizada da mucosa bucal e do complexo tratamento devido à etiologia multifatorial. A utilização contínua das próteses, a porosidade da resina acrílica, alergia ao monômero residual, a formação de biofilme, a hipossalivação e a falta de higienização são as etiologias mais comuns relacionadas a EP^{2,5,15,16,17}.

Como já mencionado, a candidíase atrófica crônica é comumente

designada estomatite dentária, é observado em pacientes que utilizam próteses removíveis mal ajustadas por períodos prolongados, principalmente pelo fato de não removê-los à noite¹⁸.

A EP pode ser classificada em três tipos, conforme proposto por Newton¹⁹:

- Tipo I: Hiperemia puntiforme (classe I) - É determinada pela hiperemia dos ductos de glândulas salivares palatinas menores o que atribui aparência eritematosa puntiforme, podendo ocupar áreas dispersas ou pequenas áreas localizadas no palato;

- Tipo II: Hiperemia difusa (classe II) - É o tipo mais frequentemente encontrado. Exibe mucosa lisa e atrófica, com aspecto eritematoso em toda a localidade sob a prótese;

- Tipo III: Hiperemia granular (classe III) - É comumente associada à câmara de sucção, emergindo à região central do palato com aspecto clínico nodular e rugoso da mucosa.

Além disso, os pacientes com estomatite apresentam usualmente quelite angular associada¹⁸. Esta variante da candidíase retrata uma combinação de fungos e infecções bacterianas. A maioria dos casos de quelite angular são ocasionados por *C. albicans* e *Staphylococcus aureus*. A forma clínica apresentada pelo paciente incide em dor e eritema e fissurando as comissuras, na maioria das vezes bilateralmente. Essa enfermidade acomete pacientes portadores de próteses dentárias, especialmente aqueles com uma antiga prótese mal ajustada. A quelite inclui deficiências nutricionais como ferro, vitamina B12, ácido fólico, tiamina, e riboflavina. Essa lesão também é notada

em pacientes dentados mais jovens que são HIV positivo, devido a diminuição da imunidade¹⁸.

Arnaud e colaboradores (2012) referiram que embora o tecido apresente-se hiperêmico e inflamado, a EP é frequentemente assintomática, e por isso, passa muitas vezes despercebida pelos usuários, sendo inesperadamente descoberta durante exame bucal de rotina. Contudo, a mucosa do paciente pode apresentar hemorragia e prurido, queimação, desconforto sabor desagradável, halitose e xerostomia²⁰.

A EP, comumente não é uma condição que traz agravos sérios ao usuário, contudo, a mucosa inflamada se torna um sustentáculo deficiente para prótese, dificultando o uso do mesmo. É considerada uma lesão bucal repetida, de fundamental importância a ser diagnosticada e tratada para melhoria da qualidade de vida dos pacientes acometidos²¹.

Biofilme

Espécies de *Candida* formadoras de biofilme em resinas acrílicas

No ser humano, a cavidade oral é um reservatório de aproximadamente 700 espécies de microrganismos, sendo 20 dessas *Candida* spp..^{11,22}. Esse microrganismo leveduriforme não é prejudicial em seres humanos saudáveis, mas pode ocasionar infecções oportunistas, em pacientes imunocomprometidos, resultando em candidíase²³ principalmente na idade senil que se faz necessário o uso de próteses artificiais resultando em mudanças no ambiente e na flora oral²⁴.

A patogenicidade da *Candida* foi concedida a diversos fatores de

virulência, englobando adesão a células hospedeiras ou dispositivos médicos, a secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases, fosfolipases e hemolisinas^{25,26}. Além disso, os principais fatores determinantes ao curso infeccioso são a saliva, formação de biofilmes e natureza do substrato, que pode variar individualmente e em relação ao tipo de microrganismo². Dentre as principais características das superfícies da prótese que favorecem a adesão desses microrganismos ressalta-se a hidrofobicidade e a rugosidade superficial.

A existência de próteses totais fornece uma superfície dura sem manchas em um ambiente estagnado para os microrganismos atacarem e colonizarem. A superfície interna da prótese dentária deve reproduzir todas as características do palato duro, tornando uma superfície desigual e rugosa, que está em contato direto com os tecidos de base e não passível de ser polida. Dessa forma, a dentadura torna-se um reservatório de colonização e conseqüente infecção. O local da prótese na mucosa oral torna a ligação da superfície menos disponível ao fluxo salivar ou inacessível a ação mecânica da língua, modificando as condições do meio ambiente. Assim, ocorre a propagação e crescimento de *Candida* spp. na área entre a prótese dentária e a mucosa portadora da prótese^{27,28,29,30}.

A rugosidade da prótese é um fator importante a adesão de microrganismos, como já mencionado. Esse parâmetro pode ser avaliado através do Ra (média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento dos pontos de perfil de rugosidade em relação a linha média do percurso de medição que é expressa em μm). Em seus estudos, Nevzatoglu e colaboradores³¹ avaliaram a rugosidade e aderência de *C. albicans* na superfície

de resinas acrílicas para base de dentadura e reembasadores com diferentes acabamentos da superfície (vidro, gesso, broca de tungstênio). Foi observado que a rugosidade foi menor nas resinas acrílicas quando comparados as bases resilientes e que a adesão de *C. albicans* foi menor em superfícies de vidro. Já as brocas de tungstênio apresentaram maiores valores enquanto que não houve diferença estatística das superfícies dos espécimes processados em gesso. Como a superfície interna das próteses não possui facilidade de ser polida mecanicamente, é considerado um campo crítico para o desenvolvimento de processos patológicos devido ao contato com os tecidos de suporte e sua topografia favorecer um acréscimo da área de nichos de retenção que favorecem a aderência de microrganismos e a formação de biofilme³².

Em 2009, Subramani e colaboradores³³ realizaram uma revisão da literatura (de 1966 e junho de 2007) referente à formação de biofilmes em implantes dentários e a influência das características de superfície (química, energia livre de superfície e rugosidade) dos materiais de implante e pilares protéticos, bem como seu desenho e formato sobre a formação de biofilme e suas consequências. Como resultante do estudo, foi possível observar que o avanço da rugosidade e da energia livre de superfície promove a formação de biofilmes em superfícies de implantes dentários e em elementos protéticos³³.

O biofilme pode colonizar qualquer tipo de prótese e essa afinidade das próteses com o biofilme sugere que 65% das infecções microbianas envolvem a presença de células sésseis². Na região centro-oeste do Brasil (Goiás) foi realizada uma pesquisa³⁴ para avaliar a colonização de leveduras do gênero *Candida* em 312 amostras de saliva de profissionais do Hospital das Clínicas da

Universidade Federal de Goiás durante o período de julho a dezembro de 2007. Os profissionais apresentaram colonização por leveduras do gênero *Candida* em 61,9% das amostras analisadas, sendo isolados *C. albicans* (58,5%), *C. parapsilosis* (24,4%), *C. krusei* (8,3%) e *C. famata* (3,6%). Inicialmente a microbiota das próteses removíveis foi considerada semelhante à da placa dentária. Entretanto, estudos recentes demonstraram que o biofilme maduro apresentou menor contagem de microrganismos nos dentes quando comparados às próteses³⁵.

A prótese dentária é composta por uma combinação de microrganismos (fungos e bactérias), bem como células epiteliais que estão conectadas dentro de uma matriz mucopolissacarídica, ideal para a ligação da placa à superfície da prótese³⁵.

Para a formação do biofilme, a prótese dentária formada com constituição a base de resina acrílica exibe carga positiva e alta energia de superfície. Isso faz com que as glicoproteínas salivares com carga negativa sejam ligeiramente atraídas formando uma estrutura semelhante à película adquirida ao dente, com intensa adesão química à prótese. A etapa seguinte é a colonização de microrganismos que também possuem carga negativa e se aproximam da película adquirida por meio de forças de Van der Waalls e se unem a ela por meio de adesinas e pontes de Hidrogênio. Ocorre uma adesão mecânica beneficiada pelas irregularidades e porosidades da resina. As adesinas são enzimas encontradas nos microrganismos que conhecem receptores específicos na película adquirida ou nas células epiteliais da boca^{36,37}. Diversos são os sintomas clínicos relatados pelos pacientes: dor, halitose, prurido e percepção

de queimação podem acontecer pelo fato da *C. albicans* produzir exoenzimas, constituídas principalmente por proteinases que facilitam a adesão do biofilme, associado a fatores do hospedeiro, tais como redução do pH, do fluxo salivar e da microbiota oral³⁸ (Figura 1).

Figura 1

Após a adesão, ocorre a proliferação das formas hifais em torno da superfície da prótese dentária e desenvolvimento do complexo microbiano. A formação de biofilmes de *C. albicans* ocorre principalmente após 24-48 horas de crescimento e ocorre em três fases: (1) adesão de blastósporos para a superfície; (2) as leveduras se multiplicam para cobrir uma extensa área superficial e ocorre a produção dos polímeros extracelulares; e, por fim, (3) ocorre a fase de maturação^{39,40}. Para as cepas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* é notório a observação de blastoconídios e pseudo-hifas. Ambas as espécies apresentam uma estrutura do biofilme em monocamada compacta não contínua, entretanto em termos de carboidratos e proteínas, *C. parapsilosis* apresenta maior quantidade. Na espécie de *C. parapsilosis* há a presença de blastoconídios, e para a *C. glabrata* observam-se somente blastoconídios com expressiva quantidade de carboidratos e proteínas em uma estrutura do biofilme em monocamada compacta ou multicamada⁴¹.

Um fator importante de comunicação que ocorre entre os microrganismos dentro do biofilme é conhecido como moléculas *quorum-sensing* (MQS). MQS são moléculas auto indutoras que, na medida que crescem proporcionam um aumento da população. Após alcançar um limiar crítico é desenvolvida uma resposta regulatória de expressão/inibição que é monitorada por genes⁴².

Em 2009, Ten Cate e colaboradores⁴³ observaram que as infecções fúngicas na cavidade bucal são ocasionadas principalmente por *C. albicans*, entretanto diversas outras espécies de *Candida* vem sendo identificadas, aumentando a sua prevalência em pacientes que utilizam próteses totais, o que ocasiona infecções invasivas com alta taxa de mortalidade.

Outros autores também sugerem que *C. albicans* ainda é considerada a espécie mais predominante e virulenta nos casos de EP, embora um aumento expressivo da prevalência de espécies de CNA vem sendo determinante de infecções em pacientes que utilizam próteses. Dentre elas destacam-se: *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*¹⁷. Além disso, Prakash et al. (2015)²³ constataram que a prevalência de diferentes espécies de *Candida* foi significativamente maior em usuários de próteses, sendo as espécies mais predominantes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliensis* e *C. glabrata*. Evidencia-se que nesse caso a idade foi um fator relacionado à prevalência de *Candida* spp..

Pathak e colaboradores et al. (2012)⁴⁴, realizaram um estudo utilizando a espécie de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) e multiespécies da microbiota oral de pacientes neutropênicos. A produção do biofilme na resina acrílica foi avaliada pelo método cristal violeta. Foi relatado que houveram diferenças entre a formação de biofilme de espécies individuais (*C. glabrata* > *C. krusei* > *C. tropicalis* > *C. albicans*) e em suas combinações de múltiplas espécies (a maior para *C. albicans* com *C. glabrata* e o menor para todas as quatro espécies de combinação).

Em 2013, Valentini e coautores⁴⁵ estudaram como o desenvolvimento e a

constituição do biofilme são afetados pelo tempo e tipo de material dentário em portadores de prótese (com e sem EP). Nesse ensaio foi utilizado a resina acrílica como controle e prótese dentária (à base de silicone ou à base de resina acrílica) na superfície intacta de 30 usuários de próteses. Como resultado, as contagens de espécies de CNA foram superiores em pacientes com próteses à base de silicone.

Sánchez-Vargas e colaboradores⁴⁶ et al. (2013) avaliaram a produção de biofilme de espécies de *Candida* e foi visto que *C. albicans* e, em menor expansão, CNA são comumente encontrados nas cavidades bucais de adultos e crianças e raramente causam doença. Sendo assim, isolados orais de *C. glabrata* foram produtores fortes de biofilme, enquanto *C. albicans* e *C. tropicalis* foram consideradas espécies produtoras moderadas.

Estudos recentes publicados por Bergamo e colaboradores³⁸ avaliaram a formação do biofilme de espécies de *C. não – albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) e *C. albicans* em resina acrílica através da contagem em UFC/mL. Através dos resultados foi observado que a menor formação do biofilme foi da *C. albicans*, com maior predomínio das demais espécies.

Tratamento

Tratamento Convencional

A busca por tratamentos pertinentes à utilização de próteses no Brasil tem se tornado mais evidente, devido aos elevados índices de edentulismo e às condições precárias de saúde bucal, indicando a necessidade da apropriação

das próteses dentárias pela população. É importante mencionar, que como tratamento básico de EP, inclui a boa higiene bucal, procedimentos de limpeza da dentadura, antifúngicos tópicos ou sistêmicos, e, em casos extremos, substituição de prótese⁴⁷.

O tratamento inserido para a *Candida* spp. é composto pelos principais grupos de fármacos como: Poliênicos (Nistatina e Anfotericina B), Triazólicos (Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol), Equinocandinas (Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina).

Em 2013, Skupien e colaboradores⁴⁸ realizaram uma revisão sistemática (1950 – 2012) avaliando a viabilidade de prevenção para a adesão de *Candida* spp. em revestimentos dentários. Em sua revisão foi visto que para prevenir ou inibir a colonização por *Candida* spp. nas lesões de EP, a nistatina (500 000 unidades), hipoclorito de sódio (0,5%), e a irradiação de microondas são os métodos alternativos mais relatados na literatura.

Em 2014, Peixoto⁴⁹ et al. realizaram um estudo avaliando o tratamento da candidíase, enfatizando que a nistatina é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da EP devido a sua eficácia e custo reduzido em comparação aos demais fármacos. A nistatina deve ser administrada em doses de 200.000 a 600.000 unidades (três a quatro vezes por dia, com instrução para bochechar e deglutir). Além disso, outro fármaco frequentemente utilizado é o clotrimazol em pastilhas orais ou comprimidos (10 mg), que devem ser administrados por 14 dias (cinco vezes ao dia).

Em 2016, Iqbal e Zafar⁵⁰ realizaram uma revisão sistemática e relataram a eficácia da adição de antifúngicos convencionais (nistatina, derivados do grupo

azol e clorhexidina, antimicrobianos, zeólito de prata, nanopartículas de prata, foto-catalisadores e óxidos metálicos óleo de árvore do chá, óleo essencial de erva-de-limão e óleo de origanum) nas próteses dentárias. Nessa revisão foi visto que a adição de agentes antifungicos é efetiva com efeitos mínimos nas propriedades e mecânicas no material.

A disponibilidade de enxaguantes bucais incluindo diversos princípios ativos (óleos essenciais, clorexidina, cloreto de cetilpiridínio) é extensivamente utilizado na clínica odontológica⁵¹. Alguns contêm 5%-25% de álcool que é usado para estabilizar e dissolver os princípios ativos com a finalidade de proporcionar refrescância, aumento no prazo de validade e prevenir a contaminação por microrganismos. Dados da literatura relataram que há possíveis efeitos colaterais na cavidade oral do indivíduo que utiliza enxaguantes a base de álcool. Além disso, é descrito que o uso dos mesmos é proibido para crianças, gestantes lactantes, diabéticos, pacientes com xerostomia e imunocomprometidos. Alguns desses quadros são condições fundamentais para a origem das candidoses⁵¹. Assim, Maekawa e colaboradores⁵¹ realizaram um estudo avaliando a atividade antimicrobiana de novos enxaguantes sem álcool com digluconato de clorexidina frente à *C. albicans*. Nesse estudo foram utilizados dois enxaguantes bucais sem etanol (Cariax[®], com 0,12% de clorexidina e fluoreto de sódio 0,05%; Orthokin[®], com 0,06% de clorexidina, fluoreto de sódio 0,05% e acetato de zinco 0,34%) comparando com o controle positivo (Periogard[®], clorexidina 0,12%, com etanol). Cariax[®] revelou atividade fungicida sobre *C. albicans* semelhante ao controle positivo, mas menor ação fungistática em comparação ao Periogard[®]. Esse autor sugeriu que a utilização de enxaguantes bucais sem álcool ainda é limitado em

casos em que há proibição dos produtos convencionais.

Embora agentes antifúngicos, como nistatina (na forma de pastilha e suspensão oral) e fluconazol (comprimido via oral), comumente usados para tratar o EP são eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da infecção por *Candida*, a repetição da infecção após o tratamento tem sido comumente reportada. Além disso, a disseminação, uso de agentes antifúngicos resultou no desenvolvimento de espécies resistentes⁵².

Desse modo, na tabela 1 foi realizada uma pesquisa sistemática na tentativa de avaliar os diversos métodos e tratamentos *in vitro/in vivo* diferentes dos tratamentos convencionais que vêm sendo estudados para a eliminação do biofilme fúngico nas próteses dentárias.

Tabela 1

Em suma, a EP ocasionada nas próteses dentárias possui extensa relação com a adesão dos microrganismos na forma de biofilme. Nesse estudo observamos que principalmente *C. albicans* é colonizadora de próteses dentárias, entretanto vem ocorrendo um aumento extensivo de CNA em relação à etiologia deste processo. Os tratamentos convencionais para a EP são capazes de minimizar a sintomatologia típica, mas devido aos casos de resistência dos microrganismos associados a essa patologia, a terapêutica pode-se mostrar ineficaz em muitos casos. Neste sentido, a busca por novas opções de agentes antifúngicos e formulações faz-se de extrema importância.

Conflito de interesses

Nenhum conflito de interesse declarado.

REFERÊNCIAS

1. Marra J, Perez LEC, Henriques TE, Pinheiro MT; de Castro FLA. Avaliação da correlação entre o grau de instruções e qualidade de higiene de usuários de próteses totais com a presença de estomatite protética. Rev Odontol Bras Central. 2017;26: 15-20
2. Melo IA, Guerra RC. Candidíase oral: um enfoque sobre a estomatite por prótese. Salusvita. 2014;33:389-414.
3. Dagıstan S, Aktas AE, Caglayan F, Ayyildiz A, Bilge M. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, *Candida*, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. Mycoses. 2009;52:266–71.
4. Arruda CNF, Salles MM, Badaró MM, de Cássia Oliveira V, Macedo AP, Silva-Lovato CH, et al. Effect of sodium hypochlorite and *Ricinus communis* solutions on control of denture biofilm: A randomized crossover clinical trial. J Prosthet Dent. 2017;117:729-734. doi: 10.1016/j.prosdent.2016.08.035. Epub 2016 Dec 4.
5. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury, AA, Crielaard W, Tem Cate JM. Development of candida-associated denture stomatitis: new insights. J Appl Oral Sci. 2008;16:86-94.
6. Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. Mycoses. 2010;53:221–6.

7. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence *in vitro* of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. Arch Oral Biol. 2010;55:763–70.
8. Park SE, Blissett R, Susarla SM, Weber HP. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. J Prosthodont. 2008;17:365–9.
9. Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107:669–72.
10. Agostinho ACMG, Campos ML, da Silveira JLGC. Edentulismo, uso de prótese e autopercepção de saúde bucal entre idosos. Rev Odontol UNESP. 2015;44:74-79.
11. Ribeiro AFL, Leal MCC, Marques APO. Importance of geriatric dentistry to elderly nutrition. *Revista Gaúcho de Odontologia*, 2012; 60:241-246.
12. Matthews DC, Clovis JB, Brilliant MGS, Filiaggi MJ, McNally ME, Kotzer RD, et al. Oral health status of long-term care residents - a vulnerable population. *J Can Dent Assoc*. 2012;78c:3.
13. Mujica V, Rivera H, Carrero M. Prevalence of oral soft tissue lesions in an elderly venezuelan population. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008;13:E270-4.
14. Avrella D, Goulart LS. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. Revista Brasileira de Análises Clínicas, Rio de Janeiro. 2008;40:205-207.
15. Sesma N, Morimoto S. Estomatite protética: etiologia, tratamento e aspectos clínicos. Journal of Biodentistry and Biomaterials. 2011;(2):24-9.

16. Corte-Real I, Figueiral M, Reis Campos J. As doenças orais no idoso – Considerações gerais, Rev Port Estomatol Med Cir Maxilofac. 2011;52:175-180.
17. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: *in vitro* study. Photomed Laser Surg. 2011;29:827-33. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2011.3022>. PMID:21916614.
18. Giannini PJ, Shetty KV. Diagnosis and management of oral candidiasis. Otolaryngol Clin North Am. 2011;44:231-40, vii. doi: 10.1016/j.otc.2010.09.010.
19. Newton A. Denture Sore Mouth – A Possible Etiology. Br Dent J. 1962;357-60.
20. Arnaud RR, Soares MSM, Dos Santos MGC, Dos Santos RC. Estomatite Protética: Prevalência e Correlação Com Idade e Gênero. Revista Brasileira de Ciências da Saúd. 2012;16:59-62.
21. Scalercio M, Valente T, Israel MS, Ramos ME. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. RGO, Porto Alegre, 2007;55:395-398.
22. Maddi A, Scannapieco F. Oral biofilms, oral and periodontal infections, and systemic disease. *Am J Dent*. 2013;26:249-254.
23. Prakash B, Shekar M, Maiti B, Karunasagar I, Padiyath S. Prevalence of *Candida* spp. among healthy denture and nondenture wearers with respect to hygiene and age. J Indian Prosthodont Soc. 2015;15:29-32. doi: 10.4103/0972-4052.155041.
24. Koch C, Bürgers R, Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. Gerodontology 2013;30:309-13.

25. Cuéllar-Cruz M, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012;7:755–71.
26. Silva MP, Chibebe Junior J, Jorjão AL, Machado AK, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AO. Influence of artificial saliva in biofilm formation of *Candida albicans* *in vitro*. *Braz Oral Res.* 2012;26:24-8.
27. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007;52:761–767.
28. Rodger G, Taylor RL, Pearson GJ, Verran J. *In vitro* colonization of an experimental silicone by *Candida albicans*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;92:226-35. doi: 10.1002/jbm.b.31509.
29. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci.* 2007;64:180-9. doi: 10.1080/09674845.2007.11732784, PMID: 18236742.
30. Czerninski R, Pikovsky A, Gati I, Friedman M, Steinberg D. Comparison of the efficacy of a novel sustained release clotrimazole varnish and clotrimazole troches for the treatment of oral candidiasis. *Clin Oral Investig.* 2015;19:467-73. doi: 10.1007/s00784-014-1259-5. Epub 2014 May 28.
31. Nevzatoğlu EU, Ozcan M, Kulak-Ozkan Y, Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin Oral Investig.* 2007;11:231-6. Epub 2007 Feb 27.

32. Al-Rifaiy MQ. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of denture base acrylic resins. *Saudi Dent J.* 2010;22:13–17.
33. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24:616–26.
34. Ataídes FS, Abrão FY, Costa CR, Silva MRR, Pimenta FC, Palos MAP et al. Identificação de espécies de *Candida* em saliva de profissionais da saúde. *Rev. Eletr. Enf.* 2010;12(3):498-501.
35. Shinawi LA. The effect of various denture cleansers on the colour stability of different denture base resins. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences.* 2017;6:238-246.
36. Borghi E. New strategic insights into managing fungal biofilms. *Frontiers in Microbiology.* 2015;6:1–6.
37. Ramage G1, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.* 2012;2012:528521. doi: 10.1155/2012/528521. Epub 2012 Feb 8.
38. Bergamo VZ, Donato RK, Nemitz MC, Acasigua GA, Selukar BS, Lopes W, et al. Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation. *J Appl Microbiol.* 2016;121:1558-1567. doi: 10.1111/jam.13283. Epub 2016 Nov 3.
39. Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Rabiei M, Hu Y, Martinuzzi R, et al. Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:4940–9.

40. Mathé L1, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet*. 2013;59:251-64. doi: 10.1007/s00294-013-0400-3. Epub 2013 Aug 25.
41. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2011 May;19(5):241-7. doi: 10.1016/j.tim.2011.02.003. Epub 2011 Mar 15.
42. Albuquerque P, Casadevall A. NIH Public Access. *Medical Mycology*. 2015;50:337–345.
43. Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009;88:105-15.
44. Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *J Appl Oral Sci*. 2012;20:70-5.
45. Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *J Dent*. 2013;41:420-7. doi: 10.1016/j.jdent.2013.02.012. Epub 2013 Feb 28.
46. Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch Oral Biol*. 2013;58:1318-26. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.06.006. Epub 2013 Jul 10.
47. Oliveira RC, Brum SC, Oliveira RS, et al, Aspectos clínicos relacionados à estomatite protética. *Internacional Journal of Dentistry*, Recife, abril/jun 2007, 6(2):51-54.

48. Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. J Prosthet Dent. 2013;110:356-62. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.07.003. Epub 2013 Aug 30.
49. Peixoto JV, Rocha MG, Nascimento RTL, Moreira VV, Kashiwabara TGB. Candidíase-uma revisão de literatura. BJSCR. 2014;8:75-82.
50. Iqbal Z, Zafar MS. Role of antifungal medicaments added to tissue conditioners: A systematic review. J Prosthodont Res. 2016;60:231-239. doi: 10.1016/j.jpor.2016.03.006. Epub 2016 Apr 13.
51. Maekawa LE, Brighenti FL, Lamping R, de Oliveira LD, Marcacci S, Koga-ito CY. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool a base de clorexidina sobre *Candida albicans*. Rev Odontol UNESP, Araraquara. 2010;39:15-19.
52. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med. 2012; 125:S3-13.
53. Zamperini CA, Carneiro Hde L, Rangel EC, Cruz NC, Vergani CE, Machado AL. *In vitro* adhesion of *Candida glabrata* to denture base acrylic resin modified by glow-discharge plasma treatment. Mycoses. 2013;56:134-44. doi: 10.1111/j.1439-0507.2012.02223.x. Epub 2012 Jul 19.
54. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wöhrle D, Dimitrov R, Popova E, et al. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. Photochem Photobiol Sci. 2011;10:91-102. doi: 10.1039/b9pp00154a. Epub 2010 Oct 29.

55. Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. Arch Oral Biol. 2009;54:588-94. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.01.016. Epub 2009 Feb 27.
56. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Palomari Spolidorio DM, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. J Dent. 2009;37:666-72. doi: 10.1016/j.jdent.2009.04.009. Epub 2009 May 4.
57. Vieira AP, Senna PM, Silva WJ, Del Bel Cury AA. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida* spp. biofilm recolonization on liner surface. Braz Oral Res. 2010;24:342-8.
58. da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, Porto VC. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. Mycoses. 2011;54:e712-7. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.02005.x. Epub 2011 May 23.
59. Yano J, Yu A, Fidel PL Jr, Noverr MC. Transcription Factors Efg1 and Bcr1 Regulate Biofilm Formation and Virulence during *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. PLoS One. 2016;11:e0159692. doi: 10.1371/journal.pone.0159692. eCollection 2016.
60. Omar Arafa, KA. Efficacy of benzoic acid denture cleansing against the colonization of *Candida albicans*. Saudi Journal for Health Sciences. 2016;5:76-81.
61. Gantait S, Bhattacharyya J, Das S, Biswas S, Ghati A, Ghosh S, et al. Comparative assessment of the effectiveness of different cleaning methods on

the growth of *Candida albicans* over acrylic surface. *Contemp Clin Dent*. 2016;7:336-42. doi: 10.4103/0976-237X.188554.

62. Song YG, Lee SH. Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on *Candida* biofilm of denture surface. *Arch Oral Biol*. 2017;76:1-6. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.12.014. Epub 2016 Dec 31.

63. Feldman M, Tanabe S, Howell A, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins inhibit the adherence properties of *Candida albicans* and cytokine secretion by oral epithelial cells. *BMC Complement Altern Med*. 2012;16:12:6. doi: 10.1186/1472-6882-12-6.

64. Raj PA, Dentino AR. New phosphated poly(methyl methacrylate) polymers for the prevention of denture-induced microbial infection: an *in vitro* study. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2011;3:25-32. doi: 10.2147/CCIDEN.S16860. Print 2011.

65. Monteiro DR, Takamiya AS, Feresin LP, Gorup LF, de Camargo ER, Delbem AC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. *J Prosthodont Res*. 2015;59:42-8. doi: 10.1016/j.jpor.2014.07.004. Epub 2014 Aug 26.

66. Salim N, Silikas N, Satterthwaite JD, Moore C, Ramage G, Rautemaa R. Chlorhexidine-impregnated PEM/THFM polymer exhibits superior activity to fluconazole-impregnated polymer against *Candida albicans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41:193-6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.09.006. Epub 2012 Nov 3.

67. Quishida CC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC4. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using

curcumin and LED light. *Lasers Med Sci.* 2016;31:997-1009. doi: 10.1007/s10103-016-1942-7. Epub 2016 Apr 28.

68. Sadeghi Ardestani Z, Falahati M, Sayah Alborzi S, Ashrafi Khozani M, Rostam Khani F, Bahador A. The effect of nanochitosans particles on *Candida* biofilm formation. *Curr Med Mycol.* 2016;2:28-33. doi: 10.18869/acadpub.cmm.2.2.1.

69. Al-Thobity AM, Al-Khalifa KS, Gad MM, Al-Hariri M, Ali AA, Alnassar T. *In Vitro* Evaluation of the Inhibitory Activity of Thymoquinone in Combatting *Candida albicans* in Denture Stomatitis Prevention. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;8;14(7). pii: E743. doi: 10.3390/ijerph14070743.

70. Gebremedhin S, Dorocka-Bobkowska B, Prylinski M, Konopka K, Duzgunes N. Miconazole activity against *Candida* biofilms developed on acrylic discs. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65:593-600.

Figuras:

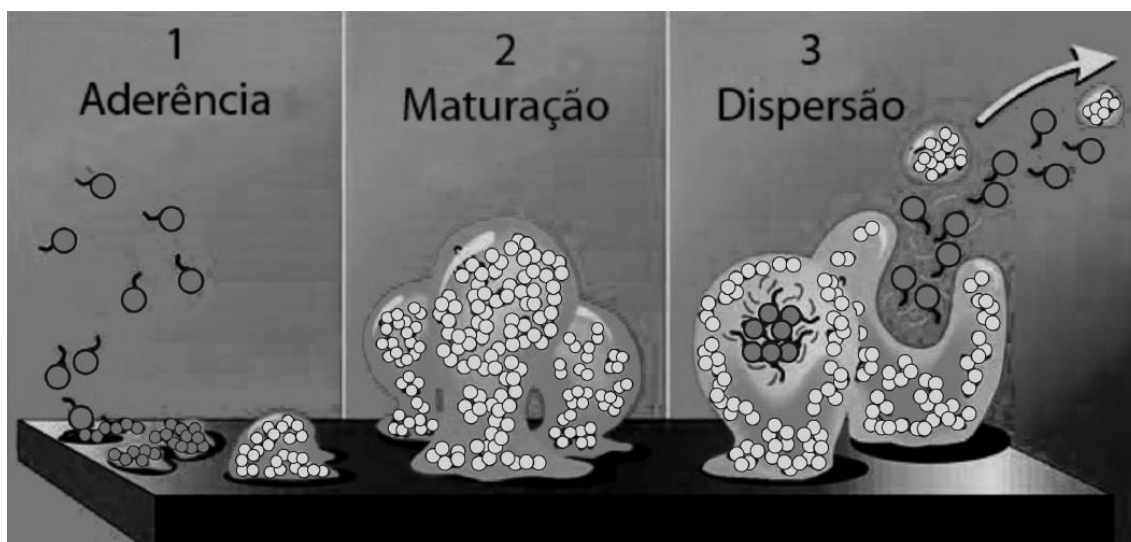


Figura 1. Esquema da formação do biofilme fúngico típico de *Candida albicans*. 1 – Aderência do microrganismo ao substrato, onde as células se replicam e começam a secretar matriz extracelular e formar as pseudo-hifas. 2 – O biofilme maduro é formado na presença de micro-colônias e hifas e da matriz polimérica extracelular que envolvem as células. 3 – As leveduras começam a dispersar do biofilme, disseminando a infecção e reinicia-se o ciclo novamente.

Tabela:

Tabela 1. Tratamentos *in vitro/in vivo* para a eliminação do biofilme fúngico nas próteses dentárias.

<i>Metodologia aplicada</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
<p>Avaliação do potencial dos tratamentos plasmáticos para modificar a química da superfície e a hidrofobicidade de uma resina de base dentária (“argon atmosphere” a 50 W (grupo Ar/50 W); “atmospheric air” a 130 W (grupo AAt/130 W) para reduzir a adesão de <i>C. glabrata</i>.</p>	<p>Tratamentos AAt/130W modificaram a composição química, hidrofobicidade e topografia da superfície acrílica. O grupo Ar/50 W apresentou uma adesão significativamente menor de <i>C. glabrata</i> do que o grupo controle, na ausência de saliva.</p>	Zamperini et al. (2013) ⁵³
<p>O fosfato catiônico e absorvente visível de absorção de luz (iii) ftalocianinas (GaPcs) substituídas periféricamente com quatro e oito grupos metilpiridiloxi foram sintetizados e investigados como sensibilizadores fotodinâmicos antimicrobianos.</p>	<p>O GaPc2 substituído com octa-metilpiridiloxi solúvel em água teve um valor potencial para o tratamento fotodinâmico de biofilmes de <i>C. albicans</i> formados na resina acrílica dentadura.</p>	Mantareva et al. (2011) ⁵⁴
<p>Foram confeccionados resinas acrílicas de saliva e inoculados com células de</p>	<p>o Hst 5 (histatina) inibiu significativamente o</p>	Pusateri et al. (2009) ⁵⁵

C. albicans durante 1 h (37 °C). Os testes de Candidacidal foram realizados em biofilmes de 48 h. A adesão celular foi comparada em discos pré-revestidos com 0,12% de gluconato de clorexidina, 50 microM Hst 5 (histatina) ou 0,6 microM hBD-3 (defensinas) após 24, 48 e 72 h de crescimento.

Modificações de superfície com tratamentos plasmáticos com diferentes hidrofobicidades (Ar/50 W, ArO₂/70 W, AAt/130 W) ou com fluoreto incorporado (Ar/SF₆ 70 W) foram avaliados para a redução a aderência de *C. albicans* a uma

Os biofilmes expostos nas próteses de 30 pacientes foram coletadas e os indivíduos foram separados por grupo: Grupo 1 (pacientes tiveram sua prótese maxilar em microondas durante 3 min (650W); Grupo 2 (pacientes tiveram sua prótese maxilar em microondas durante 2 min (650W). As amostras de biofilme

desenvolvimento do biofilme às 72 h. Por outro lado a clorexidina a 0,12% inibiu significativamente o desenvolvimento do biofilme em todos os intervalos de tempo.

Os tratamentos com plasma foram eficazes na modificação da superfície do polimetilmetacrilato (2010)⁷

Zamperini et al.

A irradiação de microondas durante 3 min (grupo 1) revelou a esterilização de todas as dentaduras. O grupo 2 resultou uma diminuição significativa em *Candida* spp. A irradiação de microondas por 3 min pode ser um

Ribeiro et al.

(2009)⁵⁶

foram coletadas com swab antes e depois da irradiação com microondas.

Os corpos de provas foram confeccionados com um revestimento de prótese de poli (metacrilato de metila) e os biofilmes de *C. albicans* ou *C. glabrata* foram formados na superfície durante 48 h e os tratamentos foram aplicados: tratamentos de limpeza: dois peróxidos alcalinos (durante 3 ou 15 min), 0,5% de hipoclorito de sódio (10 min) ou água destilada (controle, 15 min). Logo, as células de biofilme foram quantificadas (célula/mL).

Avaliação da influência da saliva artificial na formação de biofilmes por *C. albicans*. Grupos estudados: (A) saliva artificial I (carboximetilcelulose; saliva artificial; II (glicose oxidase, lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase; grupo controle (água destilada estéril).

tratamento para prevenir a contaminação cruzada.

O tratamento da prótese alcalina apresentaram (2010)⁵⁷ desempenho de limpeza semelhante e ambos diferiram do controle. O hipoclorito de sódio foi o tratamento que eliminou o biofilme e não foram encontradas células vivas após o seu uso.

Vieira et al.

Houve uma diminuição significativa de 29,89% (1,45 (2012)²⁶ UFC/mL) de *C. albicans* na saliva I em relação à saliva II (p = 0,002, considerando $p \leq 0,05$).

Silva et al.

Neste estudo *in vitro* foi utilizado uma coloração diferencial e microscopia eletrônica de varredura (SEM) para avaliar o efeito do hipoclorito de sódio e do gluconato de clorhexidina na viabilidade, remoção e morfologia do biofilme de *C. albicans* em prótese acrílica.

Foi utilizado um modelo estabelecido de EP em animais imunocompetentes com a finalidade de determinar o papel da formação de biofilmes no dano da mucosa durante a patogênese de *C. albicans*/ou mutantes defeituosos na morfogênese (*efg1 - / -*) ou formação de biofilme (*bcr1-/-*).

As amostras contendo hipoclorito de sódio são a primeira escolha de limpador de próteses dentárias em relação a 4% de clorhexidina. Isso se deve porque essas soluções destruíram os biofilmes de *C. albicans* e também a remoção na resina acrílica termopolimerizada. (2011)⁵⁸

Da Silva et al.

Foi evidenciado que os mutantes *efg1 -/-* e *bcr1 -/-* obtiveram uma redução no crescimento de biofilme com pouco ou nenhuma matriz extracelular. A quantificação da carga fúngica mostrou diminuição da colonização ao longo do período de infecção em dentaduras e palatos de ratos inoculados com *efg1 -/-*, entretanto não para *bcr1 -/-* (em relação aos (2016)⁵⁹

Yano et al.

Avaliação do efeito da dentadura embebidas pelo ácido benzóico frente a colonização de *C. albicans* em comparação com gluconato de clorexidina 0,2% (Zordyl®). grupo (1): pacientes que utilizaram ácido benzóico imersão das próteses dentárias; grupo (2): pacientes utilizaram zordil (gluconato de clorexidina (0,2%) para imersão em prótese

Avaliação do efeito do adesivo, do limpador, da clorexidina e escovação da prótese dentária frente ao biofilme de *C. albicans* desenvolvido em uma superfície acrílica para evitar a EP.

controles). Em suma, a formação de biofilmes está aliada ao dano tecidual durante a EP e que Efg1 e Bcr1 em *C. albicans* são essenciais na patogênese do EP.

Este estudo verificou que a utilização de ácido benzóico em prótese tem um efeitos de inibição contra a colonização de *C. albicans* nas superfícies dentaduras mais eficazes que gluconato de clorexidina 0,2%. (2016)⁶⁰

Omar Arafa

O adesivo de dentadura apresenta alta adesividade de *C. albicans* à superfície da dentadura. Entretanto, o limpador e a clorexidina, diminuem a adesividade. Em suma, a clorexidina inibe extensivamente a (2016)⁶¹

Gantait et al.

Avaliação da atividade antifúngica de probióticos frente *C. albicans*. O biofilme de *Candida* foi formado em uma prótese a base de resina acrílica tratado com *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei*. Os biofilmes de *L. rhamnosus* e *L. casei* foram formados e tratados com *C. albicans*. A rugosidade da superfície dentária foi avaliada com um microscópio de força atômica.

Avaliação dos efeitos das proantocianidinas (isoladas a partir de frutos de cranberry) de arando de tipo A (AC-PACs) nas propriedades patogênicas e a resposta inflamatória das células epiteliais orais induzidas por *C. albicans*. Foram utilizadas microplacas para determinar o efeito de AC-PAC sobre o crescimento de *C. albicans*, bem como a formação de biofilmes coradas com

aderência de *C. albicans* sobre a superfície da prótese.

L. rhamnosus e *L. casei* exibiram atividade antifúngica contra blastoconídios e biofilme de *C. albicans*. Nenhum dos probióticos influenciou na rugosidade superficial da resina da base da dentadura.

Song, Lee (2017)⁶²

AC-PACs não afetou o crescimento de *C. albicans*, impedindo a formação de biofilmes e diminuiu a adesão de *C. albicans* a células epiteliais orais e discos de resina acrílica revestidos com saliva.

Feldman et al. (2012)⁶³

cristal violeta. Foi realizada a adesão de *C. albicans* às células epiteliais orais e a discos de resina acrílica por fluorometria.

O poli(metacrilato de metila) (PMMA) tem sido extensivamente empregado como base de uma resina acrílica de dentadura devido às suas excelentes propriedades físicas e mecânicas. Neste estudo foi avaliada a adição de grupos fosfato em PMMA (0%, 5%, 15%, 10%, 20% e 25%) para melhorar a adsorção de antimicrobianos salivares e inibir a adesão microbiana de *C. albicans* na superfície do polímero.

Avaliação da susceptibilidade do biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata*, em seus estágios intermediários e de maturação, à influência das nanopartículas de prata (SN). Essas suspensões foram usadas para tratar os biofilmes de *Candida* durante cinco horas em superfícies acrílicas no tempo de 24 h (estágio

A presença de fosfato \geq 15% em PMMA reduziu significativamente a adesão mediada por saliva de *C. albicans*. Raj, Dentino (2012)⁶⁴

O SN proporcionou diminuições significativas na biomassa total e número de UFC de biofilmes de *Candida*. Quanto aos estágios intermediários e de maturação, não houve diferenças significativas na biomassa total do Monteiro et al. (2015)⁶⁵

intermediário) e 48 h (estágio de maturação) e sua eficácia foi determinada pela biomassa total (cristal violeta) e quantificação por UFC.

Avaliação da eficácia de um modelo acrílico de poli (etil metacrilato)/tetrahidrofurfuril metacrilato (PEM / THFM) embebido com fluconazol (FLU) ou clorexidina (CHX) na prevenção da formação de biofilme de *Candida in vitro*. Discos de PEM/THFM embebidos com CHX (n = 50) ou FLU (n = 50) e discos controle (n = 50) foram incubados com *C. albicans* 2, 7, 14, 21 ou 28 dias a 37 °C. A biomassa total do biofilme e a atividade metabólica foram quantificadas em cada ponto do tempo utilizando o cristal violeta e XTT ([2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide]).

Avaliação da inativação fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina (API) em biofilmes multiespécies de

biofilme.

Os discos FLU apresentaram inibição reduzida, com inibição metabólica e biomassa média de 12,6% e 8,8%, respectivamente. Os discos contendo CHX foram extensivamente eficazes, inibindo significativamente o desenvolvimento do biofilme em 75% e seu metabolismo em 84%. Salim et al. (2013)⁶⁶

Os biofilmes no tempo de 24 e 48 h foram suscetíveis à API mediada por Curcumina, Quishida et al. (2016)⁶⁷

C. albicans, *C. glabrata* e *Streptococcus mutans* de diferentes idades. As amostras de acrílico (n = 480) foram produzidas e incubadas com bactérias e leveduras durante 24 ou 48 h. A API foi realizada com curcumina e luz LED. Os acrílicos adicionais foram tratadas apenas curcumina ou luz LED. Amostras de controle positivo não receberam luz e nem curcumina. Após a API, foi realizada a quantificação UFC/mL, avaliação do metabolismo celular (XTT), e a biomassa total do biofilme (cristal violeta).

Avaliação do efeito inibitório de partículas de nano-quitosano em resinas acrílicas na formação de biofilme de espécies de *Candida*. As resinas acrílicas contendo as nano-quitosano (0, 1%, 5% e 10%) foram colocadas juntas à suspensão de células de *Candida* isoladas da boca dos indivíduos e a formação de biofilme nas resinas foi medida e

embora o biofilme de 24 h foi mais sensível do que o biofilme de 48 h.

As partículas de nano-quitosano nas resinas acrílicas (2016)⁶⁸ reduziu a formação de biofilme de espécies de *Candida*.

Sadeghi et al.

comparada.

Avaliação do efeito inibitório da thimoquinona embebida no material de base de prótese de polimetilmetacrilato frente a *C. albicans*. 80 corpos de prova foram divididos em oito grupos com as concentrações de thimoquinona (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% e 5% de pó acrílico).

Avaliação de uma formulação de enxaguatório bucal contendo 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio cloreto ($C_{16}MImCl$), contra biofilme de *Candida* sp.

Avaliação da atividade do miconazol em biofilmes maduros de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) *in vitro* formados em discos PMMA.

A resina acrílica contendo thimoquinona foi eficaz na prevenção da adesão a *C. albicans*. (2017)⁶⁹ Al-Thobity et al.

Ação antibiofilme efetiva da formulação contendo $C_{16}MImCl$ frente aos isolados de *Candida* spp.. (2016)³⁸ Bergamo et al.

Miconazol apresentou alta atividade antifúngica contra os biofilmes de *Candida* desenvolvidos na superfície de discos de PMMA. (2016)⁷⁰ Gebremedhin et al.

5.4 Resultados não apresentados na forma de artigo

Os resultados aqui apresentados referem-se aos estudos das associações entre antifúngicos comerciais e os biopolímeros PVOH e PDDA.

O teste de susceptibilidade foi utilizado para avaliar os fármacos antifúngicos, polímeros puros, e misturas de polímero/fármaco. Para as misturas fármaco-polímero, inicialmente, utilizou-se a mesma proporção de massa polímero/fármaco (1:1) para avaliar se a atividade antifúngica poderia estar presente nessa associação.

Considerando os polímeros puros, o PVOH não apresentou concentrações inibitórias mínimas capazes de inibir o crescimento de todos os fungos testados. Em contrapartida, o composto PDDA em água apresentou atividade antifúngica em uma faixa de 1,95-1000 µg/mL. As cepas mais sensíveis para o PDDA foram RL24 (*C. glabrata*), RL32 (*C. parapsilosis*) e RL11 (*C. parapsilosis*), apresentando valores de CIM de 1,95 µg/mL, enquanto as cepas mais resistentes (CIM de 1000 µg/mL) foram RL25 (*C. glabrata*), ATCC6258 (*C. krusei*).

Ao avaliar os fármacos comerciais puros, todas as cepas foram resistentes a CTZ (variando de 0,25 a 16 µg/mL), exceto a cepa RL22 (*C. glabrata*) que foi suscetível dose dependente. O CP apresentou CIM no valor de 0,38 µg/mL para as cepas ATCC18804 (*C. albicans*), RL24 (*C. glabrata*), 72P (*C. tropicalis*) e RL28 (*C. lusitanae*) enquanto que para as demais cepas foi encontrado um valor de 0,19 µg/mL. A CIM para o composto C₁₆MImCl variou de 0,39 a 6,25 µg/mL. Para o ITR, as CIMs obtidas variaram em uma faixa de 1 a 128 µg/mL (todas as cepas foram resistentes ao ITR). AND apresentou atividade antifúngica em uma faixa de 0,016 x 10⁻² a 0,50 µg/mL, enquanto as cepas ATCC6258 (*C. krusei*), RL28 (*C. lusitanae*), RL24 (*C. glabrata*), RL32 (*C. parapsilosis*), RL11 (*C. parapsilosis*) foram resistentes a este composto. Todas as cepas foram resistentes à AMB, exceto ATCC6258 (*C. krusei*) e RL28 (*C. lusitanae*), que foram sensíveis, com valores de CIM de 0,063 µg/mL e 0,25

µg/mL, respectivamente.

Na presença de sistemas PVOH/fármaco (1:1), as concentrações de PVOH/CTZ variaram de 0,25 a 8 µg/mL, enquanto o fármaco sozinho variou de 0,25 a 16 µg/mL. Na associação PVOH/CP não houve alteração no perfil de susceptibilidade das cepas testadas quando comparado ao CP. Para o PVOH/C₁₆MImCl, as concentrações diminuíram consideravelmente ($9,00 \times 10^{-2}$ a 0,78 µg/mL) quando comparadas ao C₁₆MImCl puro (0,39 a 6,25 µg/mL). Somente para as cepas ATCC6258 (*C. krusei*), RL28 (*C. lusitanae*), RL24 (*C. glabrata*) e 72P (*C. tropicalis*) não houve melhora na atividade antifúngica. No que diz respeito ao sistema PVOH/ITR, as cepas ATCC18804 (*C. albicans*), RL32 (*C. parapsilosis*), RL11 (*C. parapsilosis*), 72A (*C. tropicalis*), 57A (*C. tropicalis*) e ATCC6258 (*C. krusei*) apresentaram susceptibilidade (1 a 32 µg/mL), enquanto as demais cepas foram resistentes a este sistema. Quando AND foi associado com PVOH (PVOH/AND), observou-se uma diminuição nos valores de CIM, 65 a 512 vezes menores que os valores de AND puros ($2,40 \times 10^{-4}$ a $6,30 \times 10^{-2}$ µg/mL). Excepcionalmente, as cepas RL20 (*C. parapsilosis*) e RL22 (*C. glabrata*) não apresentaram sua atividade alterada na presença de PVOH/AND, no entanto, essas cepas já eram sensíveis à AND pura produzindo um baixo valor de CIM (0,063 µg/mL). Diferentemente, usando o sistema PVOH/AMB, todas as cepas mantiveram valores de CIM inalterados quando comparados à AMB. Além disso, as cepas ATCC6258 (*C. krusei*) e RL28 (*C. lusitanae*) foram mais resistentes à associação (0,125 µg/mL e 0,5 µg/mL, respectivamente).

Considerando os sistemas PDDA/fármaco (1:1), PDDA/CTZ produziu uma melhoria na atividade antifúngica em comparação com CTZ puro, onde a CIM obtida foi de 0,5 µg/mL para todas as cepas testadas, com exceção das cepas RL11 e RL22 que foram resistentes a associação. O PDDA/CP apresentou uma diminuição de 270 vezes nos valores de CIM quando comparado ao CP puro ($7,00 \times 10^{-4}$ µg/mL para as cepas ATCC18804, RL24, RL32, RL11, RL20, 72A e 57A). O sistema PDDA/C₁₆MImCl também apresentou uma mudança no perfil de susceptibilidade onde as CIMs variaram de 0,19 a 1,56 µg/mL e todas as cepas foram sensíveis a esta combinação. Além disso, PDDA/ITR também

reduziu a concentração (0,25 µg/mL) para todas as cepas testadas em comparação com ITR puro. A associação PDDA/AMB apresentou apenas uma melhoria de atividade satisfatória contra as cepas (em uma faixa de concentração variando de $1,50 \times 10^{-2}$ a 1 µg/mL), uma vez que a maioria das cepas foram resistentes à AMB. Quando a associação PDDA/AND foi aplicada produziu valores de CIM entre $1,20 \times 10^{-4}$ a $4,80 \times 10^{-4}$ µg/mL, uma redução considerável da CIM (entre 130.000 e 266.000 mil vezes) quando comparada à AND pura.

O sistema PVOH/AND na proporção 99:1 produziu uma redução considerável da CIM, na faixa de $1,50 \times 10^{-2}$ a $7,50 \times 10^{-6}$ µg/mL, valores 2.000 vezes menores que o fármaco AND. As cepas ATCC6258 (*C. krusei*), RL28 (*C. lusitanae*), RL24 (*C. glabrata*), RL32 (*C. glabrata*) e RL11 (*C. parapsilosis*) que foram resistentes à AND e, embora o PVOH puro apresentasse nenhuma atividade antifúngica, observou-se uma alteração considerável no perfil de susceptibilidade quando PVOH/AND foi aplicado inibindo o crescimento fúngico nas CIMs $2,40 \times 10^{-4}$ µg/mL; $2,40 \times 10^{-4}$ µg/mL; $1,60 \times 10^{-2}$; $4,80 \times 10^{-4}$ µg/mL e $3,90 \times 10^{-3}$ µg/mL, respectivamente. Para PVOH/AMB (99:1), houve uma alteração da proporção 1:1 (AMB), onde todas as cepas que foram resistentes, tornaram-se sensíveis, com valores de CIM em uma faixa de 0,25 a 4 µg/mL. As cepas ATCC6258 (*C. krusei*) e RL28 (*C. lusitanae*) foram resistentes a esta associação. Na combinação PDDA/AMB, todas as cepas foram sensíveis à associação ($9,80 \times 10^{-5}$ a 2 µg/mL) quando comparados à AMB, com exceção da cepa RL28 (*C. lusitanae*) que foi resistente apresentando CIM de 2 µg/mL. Interessantemente, PDDA/AND (99:1) apresentou valores de CIM extremamente baixos ($3,10 \times 10^{-5}$ a $7,63 \times 10^{-6}$ µg/mL), uma redução de cerca de 4.000.000 vezes em comparação com AND pura.

Na proporção de 1:99, PVOH/AND diminuiu os valores de CIM quando comparados ao AND puro, onde as cepas ATCC6258 (*C. krusei*), RL28 (*C. lusitanae*), RL24 (*C. glabrata*), RL32 (*C. parapsilosis*) e RL11 (*C. parapsilosis*) que foram resistentes a AND, tornaram-se suscetíveis à associação ($3,10 \times 10^{-2}$ µg/mL; $3,10 \times 10^{-2}$ µg/mL; $1,60 \times 10^{-2}$ µg/mL; $1,60 \times 10^{-2}$ µg/mL; $1,60 \times 10^{-2}$ µg/mL, respectivamente). PVOH/AMB e PDDA/AMB apresentaram

diminuições na CIM contra todos as cepas testadas ($3,13 \times 10^{-2}$ a $1,25 \times 10^{-1}$ $\mu\text{g/mL}$ e $1,90 \times 10^{-4}$ a $1,00 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). O efeito mais considerável foi observado para a combinação PDDA/AND, que apresentou a atividade antifúngica com CIMs extremamente baixas para todas as cepas testadas, variando de $9,50 \times 10^{-7}$ a $1,20 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$. Todos esses dados estão resumidos na tabela 4.

<i>PDDA</i>		1:1	7,00x10 ⁻⁴	9,50x10 ⁻²	0,38	7,00x10 ⁻⁴	0,19	0,19	7,00x10 ⁻⁴	7,00x10 ⁻⁴	7,00x10 ⁻⁴	7,00x10 ⁻⁴	7,00x10 ⁻⁴	0,38
-		-	0,50	64	64	1	6,30x10 ⁻²	6,30x10 ⁻²	32	32	6,30x10 ⁻²	1,60x10 ⁻²	1,60x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²
<i>PVOH</i>		1:1	6,30x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²	6,30x10 ⁻²	6,30x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²	6,30x10 ⁻²	6,30x10 ⁻²	6,30x10 ⁻²	4,80x10 ⁻⁴	2,40x10 ⁻⁴	1,50x10 ⁻²
<i>PVOH</i>		99:1	3,90x10 ⁻³	2,40x10 ⁻⁴	2,40x10 ⁻⁴	0,016	3,90x10 ⁻³	2,40x10 ⁻⁴	4,80x10 ⁻⁴	3,90x10 ⁻³ ₃	1,95x10 ⁻³	7,50x10 ⁻⁶	4,80x10 ⁻⁴	1,50x10 ⁻²
<i>PVOH</i>	AND	1:99	1,60x10 ⁻²	3,1 x10 ⁻²	3,1x10 ⁻²	1,60x10 ⁻²	1,60 x10 ⁻² ₂	3,1 x10 ⁻²	1,60 x10 ⁻² ₂	1,60x10 ⁻²	7,80x10 ⁻⁴	4,80x10 ⁻⁴	2,40x10 ⁻⁴	0,015
<i>PDDA</i>		1:1	1,20x10 ⁻⁴	4,80x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴	1,20x10 ⁻⁴
<i>PDDA</i>		99:1	3,10x10 ⁻⁵	2,40x10 ⁻⁴	2,40x10 ⁻⁴	3,05x10 ⁻⁵	3,05x10 ⁻⁵	2,40x10 ⁻⁴	7,63x10 ⁻⁴	7,63x10 ⁻⁶	7,63x10 ⁻⁶	2,40x10 ⁻⁴	2,40x10 ⁻⁴	2,40x10 ⁻⁴
<i>PDDA</i>		1:99	1,90x10 ⁻⁶	1,90x10 ⁻⁶	1,22x10 ⁻⁴	3,82x10 ⁻⁶	9,52x10 ⁻⁷	1,22x10 ⁻⁴	3,81x10 ⁻⁶	1,90x10 ⁻⁶	9,52x10 ⁻⁷	3,81x10 ⁻⁶	9,52x10 ⁻⁷	3,82x10 ⁻⁶
-		-	8	6,3x10 ⁻²	0,25	8	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>PVOH</i>		1:1	8	1,25x10 ⁻¹	0,50	8	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>PVOH</i>	AMB	99:1	0,25	0,25	1	4	1	1	1	2	1	1	1	2
<i>PVOH</i>		1:99	1,25x10 ⁻¹	1,25x10 ⁻¹	1,25x10 ⁻¹	1,25x10 ⁻¹	3,13x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²	1,25x10 ⁻²	6,25x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²	3,13x10 ⁻²	1,25x10 ⁻¹	3,13x10 ⁻²
<i>PDDA</i>		1:1	1	0,25	1	1,50x10 ⁻²	1,25x10 ⁻¹	1	1,50x10 ⁻²	1,50x10 ⁻²	6,30x10 ⁻²	0,25	6,30x10 ⁻²	0,25

<i>PDDA</i>		99:1	2	$7,80 \times 10^{-3}$	2	$1,10 \times 10^{-4}$	0,25	2	$5,80 \times 10^{-5}$	0,03	$9,80 \times 10^{-5}$	0,50	0,13	0,50
<i>PDDA</i>		1:99	$1,90 \times 10^{-4}$	$9,70 \times 10^{-4}$	1	$4,60 \times 10^{-4}$	$9,70 \times 10^{-4}$	0,50	$4,60 \times 10^{-4}$	$9,00 \times 10^{-4}$	$1,90 \times 10^{-3}$	$9,70 \times 10^{-4}$	$1,90 \times 10^{-3}$	0,13
-	C₁₆MImCl	-	1,56	0,78	1,56	0,78	1,56	6,25	0,78	0,39	1,56	1,56	1,56	0,78
<i>PVOH</i>		1:1	0,78	6,25	12,50	0,78	0,78	0,19	0,19	$9,00 \times 10^{-2}$	0,39	0,39	0,39	0,78
<i>PDDA</i>		1:1	0,19	1,56	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
-	ITR	-	128	32	64	64	128	8	1	128	1	16	4	8
<i>PVOH</i>		1:1	32	4	128	256	128	128	0,5	32	128	0,5	1	8
<i>PDDA</i>		1:1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

PVOH: álcool polivinílico altamente amorfo; **PDDA:** cloreto de poli(dialildimetilamônio); **CTZ:** Cetoconazol; **CP:** Cloreto de Cetilpiridínio; **AND:** Anidulafungina; **AMB:** Anfotericina B; **C₁₆MImCl:** 1-metil-3-hexadecilimidazol; **ITR:** Itraconazol.

Na proporção 1:1, as análises realizadas para avaliar a carga do fármaco (CTZ, CP, AND, AMB, C₁₆MImCl, ITR) ou polímero (PVOH, PDDA) em água ou em associação (polímero/fármaco) foi verificado um aumento do potencial zeta com decréscimo do tamanho da partícula (Figura 10 e Figura 11). Para o PDDA/fármaco, o tamanho da partícula variou entre 2 e 6 nm, apresentando potencial entre 50 e 75 mV. Em contrapartida, para o PVOH, o tamanho da partícula variou entre 8 e 10 nm, com potencial entre 15 e 45 mV (Figura 10 e Figura 11). As interações fármaco/água, polímero/água apresentaram potencial variando entre -20 e 50 mV.

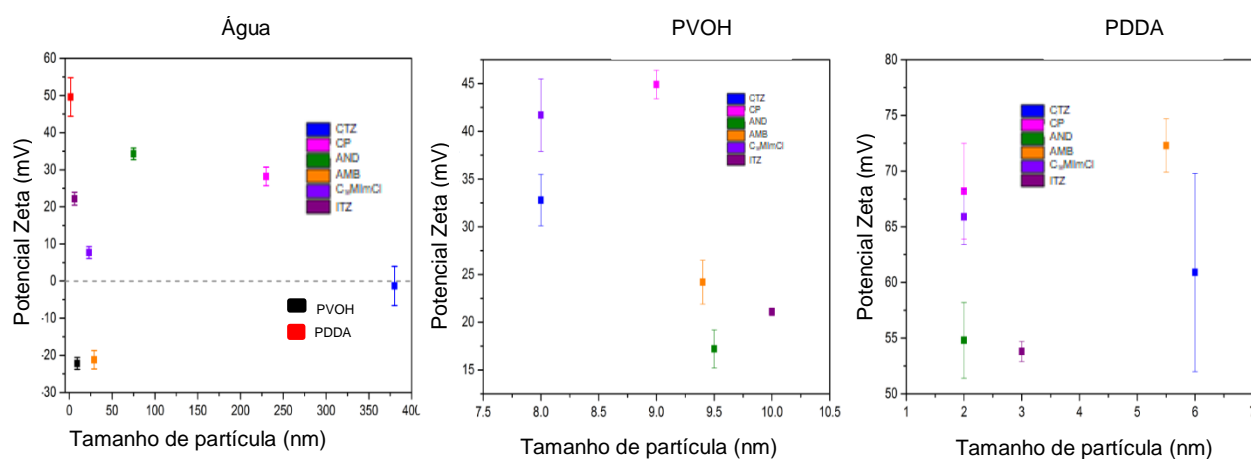


Figura 10. Carga do fármaco (CTZ, CP, AND, AMB, C₁₆MImCl, ITR) ou polímero (PVOH, PDDA) em água ou em associação (polímero/fármaco)

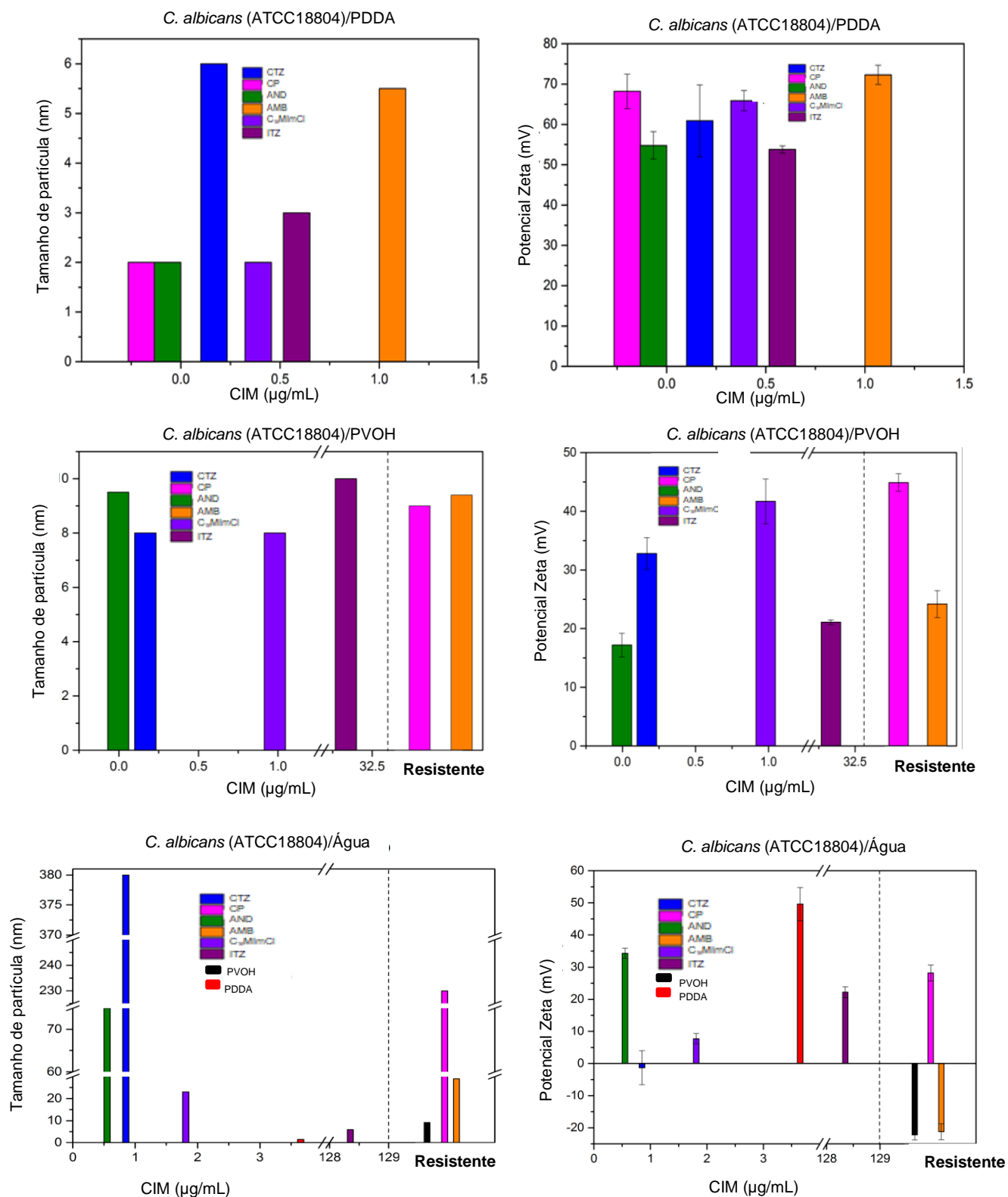


Figura 11. Avaliação tamanho da partícula/carga do fármaco (CTZ, CP, AND, AMB, C₁₆MImCl, ITR) em água ou em associação (polímero/fármaco) comparados aos valores de CIM obtidos frente a cepa de *C. albicans*

Para avaliar a interação polímero/fármaco foi utilizada a espectroscopia Raman. A amostra de AMB (na ausência dos polímeros) apresentou intensidades de bandas muito baixas, a primeira em 2439 cm^{-1} e a segunda em 2906 cm^{-1} . Por sua vez, a AND apresentou várias bandas em 1465 , 1611 , 2908 , 2956 e 3401 cm^{-1} , sendo esta última a mais intensa. No caso do PVOH, por conta da luminescência, não foi possível obter espectros do polímero puro e nem do mesmo combinado à AMB. No entanto, para o polímero combinado à AND, apesar da luminescência, foi coletado o espectro com bandas em 1436 e 2918 cm^{-1} , as mesmas regiões obtidas para o antifúngico puro, indicando tanto a presença de C=C quanto a de grupos carbonílicos. No caso do PDDA, verificou-se um espectro cujas bandas aparecem em 1468 , 1533 e 1780 cm^{-1} . A banda de maior intensidade foi em 2444 cm^{-1} , relacionada à presença do nitrogênio entre os carbonos do anel. Para o sistema PDDA/AMB, o espectro apresentou bandas em 1436 cm^{-1} , indicando a presença de C=C, e 2918 cm^{-1} , evidenciando os grupos carbonílicos. O sistema PDDA/AND apresentou bandas em 1352 e 2851 cm^{-1} , diferentes dos espectros do fármaco e do polímero puros (Figura 12).

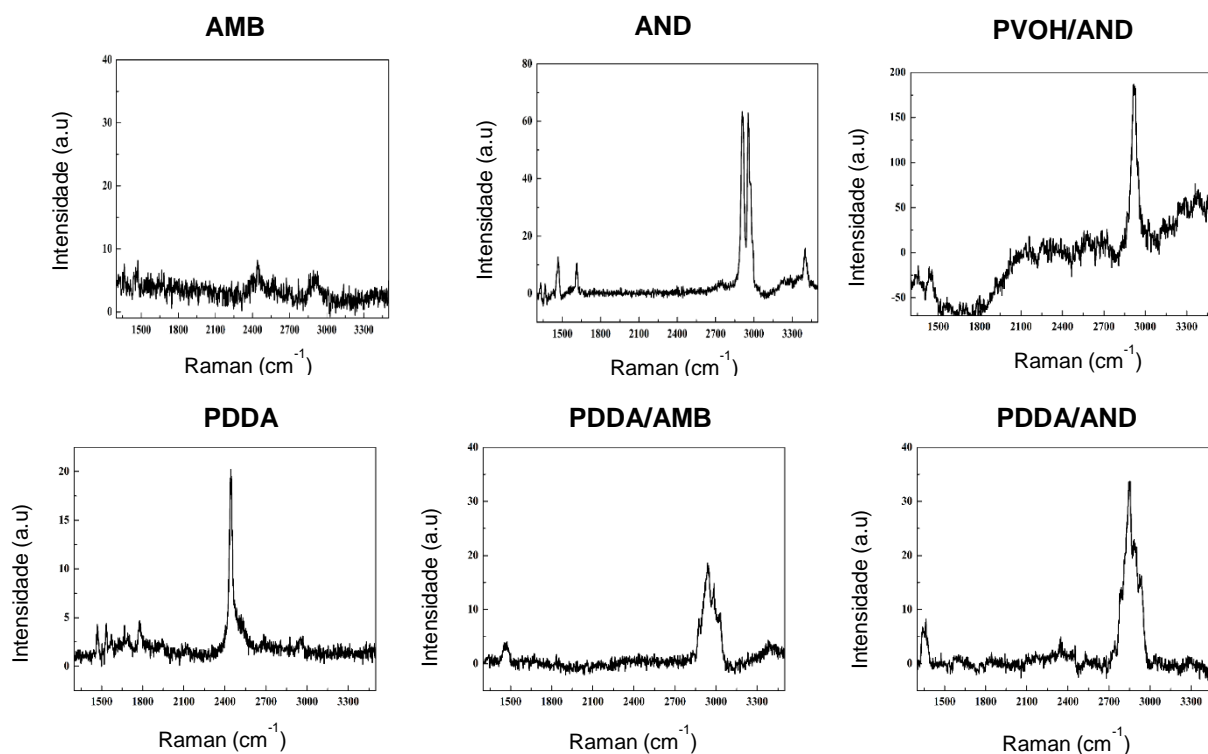


Figura 12. Interação polímero/fármaco através da espectroscopia Raman

Na microscopia óptica, utilizada para avaliar a interação polímero/fármaco, foi observado que os fármacos AND e AMB apresentaram estruturas cristalinas e amorfas, respectivamente. Os polímeros apresentaram características adversas, sendo o PVOH com estrutura amorfa e o PDDA com um comportamento cristalino. Quando os fármacos foram associados aos polímeros verificou-se uma mudança de estrutura, como pode ser observada na figura 13. Para todas as associações polímero/fármaco foi observado um comportamento aglomerativo, amorfo e sem organização cristalina.

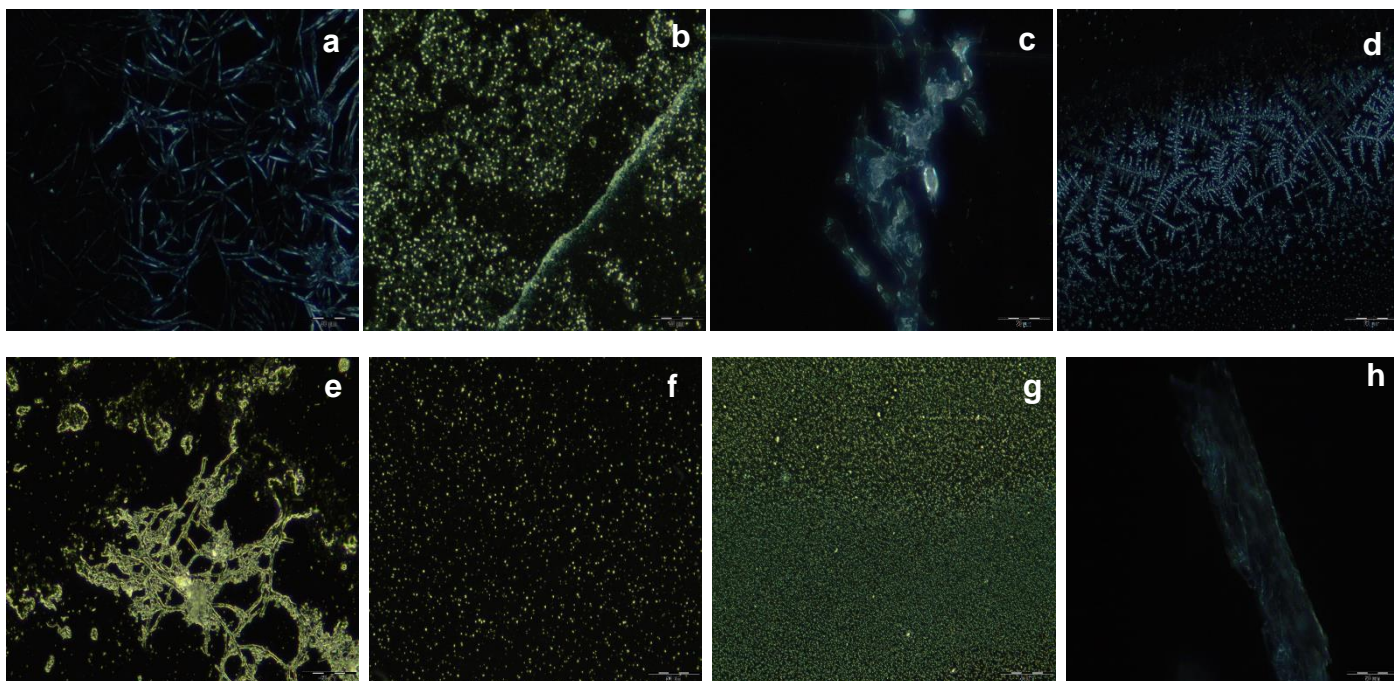


Figura 13. Microscopia Óptica da AND (a), AMB (b), PVOH (c), PDDA (d), PVOH/AND (e), PDDA/AND (f), PVOH/AMB (g), PDDA/AMB (h); Dark Field, 40x.

Estudos detalhados da interação entre fármacos e polímeros, principalmente com o objetivo de entender os dramáticos decréscimos da CIM para algumas associações, estão em andamento.

6. DISCUSSÃO GERAL

A formação do biofilme na superfície das próteses dentárias atua no desenvolvimento da EP, promovendo a patogenicidade das espécies de *Candida* na mucosa oral. Esta infecção pode ocasionar uma doença oral que justifica o uso de antimicrobianos para controlar o rápido crescimento microbiano. No entanto, a resistência aos antifúngicos tradicionais surge a longo prazo ou na abordagem profilática aos pacientes imunossuprimidos (Lewis, 2011; Lazarin et al., 2014; Al-Fouzan et al., 2017).

Os resultados do nosso estudo ressaltam a capacidade de espécies de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* formarem biofilme na superfície da resina acrílica (Tabela 2, artigo 1; Tabela 3, artigo 2), como demonstrado em estudo anteriores realizados com espécies de *Candida* (Jayatilake et al 2006; Lima-Neto et al. 2011; Weerasekera et al 2017). *C. tropicalis* exibiu maior habilidade do que *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. albicans* para colonizar e formar o biofilme na resina acrílica.

Apesar do conhecimento previo da atividade antifúngica e antibiofilme do C₁₆MImCl (Bergamo et al., 2015a, Bergamo et al., 2015b) e atividade antifúngica dos selenocianatos alílicos frente as cepas de *Candida* spp., fungos filamentosos, bem como vários isolados clínicos de *Fusarium* spp (Silveira et al., 2017; Batista et al., 2017), pela primeira vez, formulações de enxaguantes bucais foram desenvolvidas expandindo assim o conhecimento para o uso desses compostos como medicamentos farmaceuticos aplicáveis. Em nosso estudo, verificamos que a concentração de C₁₆MImCl utilizada tanto para a solução aquosa como para as formulações de enxaguantes bucais (F1 e F2) foi de 50 µg/mL, uma concentração dez vezes menor do que a dosagem CP comum utilizada em formulações preparadas ou comerciais (Corbin et al., 2011; Shim et al., 2012). Os resultados com os selenocianatos alílicos **1-3** mostraram uma expressiva atividade antibiofilme pelo método cristal violeta (150 µg/ml, Tabela 2, artigo 2), o que nos permitiu desenvolver seis formulações de enxaguantes bucais contendo 0,015% destes compostos como principio ativo. Destaca-se que as formulações foram desenvolvidas com um único princípio ativo

(selenocianatos alílicos **1-3**) em menor concentração (0,015%) quando comparados com os quatro princípios ativos presentes na fórmula do Listerine® (Ramage et al., 2011; Fu et al., 2014).

Todas as formulações de enxaguantes bucais contendo o C₁₆MImCl apresentaram atividade antibiofilme *ex vivo* contra *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* (inibição em logCFU cm², Tabela 2, artigo 1). No entanto, para o ensaio com o corante MTT (Figura 2, artigo 1), F1 mostrou uma atividade antibiofilme similar com seu controle para quatro cepas, enquanto que F2 apresentou atividade antibiofilme estatisticamente diferente do controle para todos as cepas testadas (One-Way ANOVA, e teste Tukey com $\alpha=0.05$). Isso indica que a presença do conservante (sorbato de potássio) em F1 poderia mascarar a atividade do C₁₆MImCl. Outra possibilidade desse resultado é que o conservante poderia interagir ou trocar íons com o C₁₆MImCl (como são ambas espécies iônicas) que afetariam a atividade do C₁₆MImCl.

Assim, a formulação F2 foi selecionada para a continuação dos testes posteriores. Tanto os resultados em UFC/mL quanto do MTT confirmaram que o F2 exerce um efeito antibiofilme similar ou mesmo maior do que F3 e Colgate, que são preparações amplamente utilizadas por pacientes na rotina dental. Além disso, a semelhança estrutural entre C₁₆MImCl (apresentando um anel de imidazolio carregado positivamente) e CP (apresentando um anel de piridínio carregado positivamente) (Figura 1, artigo 1) sugere um papel importante da cabeça catiônica na inibição de espécies patogênicas de *Candida* spp. (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*). Outros estudos confirmam que as moléculas com cátions funcionalizados de cadeia alifática longa têm um potencial equilíbrio anfifílico, essencial tanto para suas atividades antifúngicas quanto para antibiofilme (Pernak et al., 2003; Carson et al. 2009; Bergamo et al., 2015a; Dalla Lana et al. 2015).

Adicionalmente, os dados obtidos para as formulações contendo os princípios ativos selenocianatos alílicos (**1-3**) em relação aos controles (FA e FA*), indicaram que S1, S1*, S3 e S3* exibiram o mesmo nível de atividade antibiofilme para *C. tropicalis* (em UFC/cm²). Como esperado, a ausência dos selenocianatos alílicos **1-3** nos controles FA e FA* não resultou em formulações

com propriedades antibiofilmes (Tabela 3, artigo 2). A atividade antibiofilme das formulações desenvolvidas foram comparadas com Listerine® (Tabela 3, artigo 2). A inibição total do biofilme sobre as resinas acrílicas na presença das formulações S1-S3 e formulações sem sorbato de potássio (S1-S3*) foi melhor do que a inibição do biofilme causada por Listerine®. A presença do DMSO nas formulações desenvolvidas foi avaliada (FAD e FAD*). Através do ensaio em contagens de colônias (UFC/cm²) verificou-se que não houve interferência do DMSO nas atividades antibiofilmes de S1-S3 (1,5% de DMSO). De acordo com a literatura, até 2% do DMSO nas formulações não influenciam o crescimento dos fungos (Rodríguez-Tudela et al., 2001).

Para otimizar o processo de avaliação dos enxaguantes bucais, a técnica da MEV foi utilizada para verificar o possível dano ocasionado das formulações de enxaguantes bucais na resina acrílica. Como resultado, as imagens da MEV mostraram que os biofilmes formados por *C. tropicalis* (72P, Figura 4a-c, artigo 1) e 72A (Figura 2a-e, artigo 2) apresentaram uma rede densa de leveduras, tubos germinativos, hifas pseudo-hifas. Na presença do composto C₁₆MImCl nas formulações de enxaguantes bucais, foram observadas células de levedura ou pseudo-hifas, o fator que contribuiu para a ausência de arquitetura de biofilme e material de matriz extracelular (Figura. 4 d-f, artigo 1). O mesmo efeito foi observado para as formulações contendo os selenocianatos alílicos **1-3**. A matriz extracelular raramente foi observada, um fator essencial que demonstrou que esses compostos foram capazes de destruir o principal componente do biofilme (Figura 2f-m, artigo 2).

Nesses estudos, a técnica HET-CAM também foi avaliada. O HET-CAM é um ensaio de toxicidade semi-quantitativo para medir o nível de irritabilidade das moléculas nos produtos cosméticos a nível de mucosa (ICCVMA, 2010). Para a formulação F2 e a solução aquosa C₁₆MImCl (Figura 5, artigo 1), ambas foram classificadas como não irritantes para a mucosa embrionada, isto é, C₁₆MImCl não ocasionou irritação quando em contato com tecido biológico. Além disso, este ensaio já foi conduzido para verificar o potencial alérgico dos selenocianatos alílicos **1-3** (50 µg/ml) (Silveira et al., 2017; Batista et al., 2017). Os resultados obtidos do nosso estudo verificou claramente

que os compostos **1-3**, como princípios ativos de S1-S3 (150 µg/ml), não foram irritantes para a mucosa embrionária.

Adicionalmente, no nosso estudo foram utilizados agentes antifúngicos comerciais de diferentes classes, tais como AND (Equinocandina), AMB (Poliênico), CTZ (Imidazol), ITR (Triazol), bem como C₁₆MImCl e CP (antifúngicos iônicos) com o intuito de avaliar a susceptibilidade de *Candida* spp. Esses compostos foram avaliados na presença ou ausência da matriz polimérica solúvel em água (PVOH e PDDA). Com esta configuração, incluindo polímeros e fármacos neutros e iônicos, muitos parâmetros de interação de polímero-fármaco serão revelados. Além disso, o uso de diferentes razões de polímero/fármaco (1:1, 99:1 e 1:99) permitirá prospectar as aplicações potenciais, por exemplo, embalagens antimicrobianas (pequena quantidade de fármaco em uma matriz de polímero) e formulações de fármacos com um aditivo polimérico (pequena quantidade de polímero adicionado a um fármaco), e também na implementação de filmes e injetáveis. Para isso, o teste de susceptibilidade foi utilizado para avaliar os antifúngicos, polímeros puros e misturas de polímero/fármaco. Para as misturas fármaco-polímero, inicialmente, utilizou-se a mesma proporção de massa de polímero/fármaco (1:1) para avaliar se o efeito antifúngico poderia estar presente.

Para os polímeros puros, foi verificado que PVOH não apresentou CIMs capazes de inibir o crescimento de todos os fungos testados, fato importante que ainda não foi relatado na literatura. Em contraste, o polímero PDDA em água apresentou atividade antifúngica (1,95-1000 µg/mL). Estes resultados corroboram com o efeito anteriormente descrito de que os polications enfraquecem a membrana plasmática das bactérias (Wang et al., 2016). Além disso, Melo e Carmona-Ribeiro (2012) verificaram a montagem do brometo de dioctadecildimetilamônio catiônico (DODAB) e polieletrólitos carboximetilcelulose (CMC) e PDDA, onde esta combinação apresentou atividade contra *C. albicans* na ausência de fármacos.

Considerando a relevância das micoses invasivas, são necessárias múltiplas estratégias terapêuticas. Neste estudo, a terapêutica foi realizada com azóis e AMB. No entanto, dada a crescente resistência ao grupo azol,

ocasionada principalmente por espécies de CNA e devido à toxicidade renal da AMB, um novo grupo farmacológico (as equinocandinas) emergiu como uma nova opção terapêutica (Pham et al., 2014). *Candida glabrata* foi a primeira espécie de *Candida* que foi detectada com significativa resistência às equinocandinas (Silva et al., 2012). Nossos resultados corroboram com este autor e verificou-se que, além da *C. glabrata*, ATCC6258 (*C. krusei*), RL28 (*C. lusitanae*) e RL11 (*C. parapsilosis*) foram resistentes a este fármaco.

Em um sentido geral, AND apresentou os melhores efeitos com ambos os polímeros (1:1), diminuindo drasticamente os valores de CIM quando comparados ao fármaco puro. Por outro lado, o PVOH/AMB apresentou um efeito antagonista na mesma proporção. Conforme descrito anteriormente por Anderson et al. (2014), a AMB atua formando agregados de canais inseridos na membrana, com moléculas de ergosterol interdigitadas entre as moléculas de AMB. Além disso, o mesmo autor justifica que esta molécula existe como grandes agregados extra membranosos que extrai o ergosterol das bicamadas lipídicas, evitando assim o crescimento do fungo.

CTZ, ITR são fármacos amplamente utilizados para o tratamento de infecções tópicas e sistêmicas (Benhamou et al., 2017). Nas proporções 1:1 (polímero/fármaco), a presença dos polímeros possibilitou os efeitos desses fármacos, especialmente na presença de PDDA que já possuía uma atividade antifúngica intrínseca. Além disso, CP e C₁₆MImCl são compostos que apresentam atividade antifúngica e antibiofilme em próteses dentárias frente *Candida* spp. (Bergamo et al., 2016). Nesse estudo, foi observado a atividade antifúngica dos fármacos em água e também no sinergismo com os polímeros testados, exceto para a associação PVOH/CP. No entanto, a associação do PDDA/CP, PVOH/C₁₆MImCl e PDDA/C₁₆MImCl diminuiu as concentrações quando comparadas aos fármacos originais.

Após a aplicação da proporção 1:1 para verificar a associação direta dos polímeros versus fármacos, foi avaliada as proporções 99:1 e 1:99 (polímero/AND ou polímero/AMB), ou seja, dois extremos de concentração foram estudados visando similar aplicações reais, tais como a aditivação de medicamentos e embalagens especiais. O sistema PVOH/AMB, PVOH/AND na

proporção 99:1 e 1:99 produziu uma redução da CIM, onde a maioria das cepas testadas foram sensíveis à associação. Interessantemente, PDDA/AND e PDDA/AMB foram as melhores combinações com a capacidade de inibir os fungos testados.

A atividade antifúngica apresentada pela associação dos polímeros/fármacos nas diferentes proporções poderia ser explicada através das interações físico-químicas, tamanho de partícula e potencial zeta. Através desses parâmetros, sugere-se a possível formação de estruturas do tipo micelar, com diminuição do tamanho da partícula e aumento do potencial zeta, facilitando assim, a entrada do fármaco dentro da célula fúngica. (Timofeeva & Kleshcheva, 2011). Além disso, as estruturas policatiônicas do PDDA (polímero iônico) geralmente exibem alta atividade biológica quando comparadas com PVOH (polímero neutro) devido à localização de massa e carga que fornece interações eletrostáticas (interação do tipo força de van der Waals) entre a estrutura catiônica e a membrana/parede do microrganismo carregado negativamente, o que resulta em ruptura da estrutura celular.

Vieira e Carmona-Ribeiro (2006) avaliaram o modo de ação da PDDA como agente antifúngico. Como resultado, demonstrou-se que o fenômeno crítico que determina o efeito antifúngico dos surfactantes catiônicos não é a lise celular, mas a reversão da superfície celular da carga (negativa a positiva). Pelos nossos estudos sobre a carga superficial do complexo polímero/fármaco, visualizados pelo potencial zeta e do tamanho de partícula, verificou-se que o aumento do valor de potencial zeta (mV) e a diminuição do valor de tamanho de partícula podem levar a uma maior estabilidade físico-química do complexo e a facilitação da interação entre o microrganismo e o fármaco disperso na matrix polimérica. Ainda assim, foi possível verificar mediante destas análises que a maioria das cepas testadas foram sensíveis aos fármacos em PDDA devido ao menor tamanho de partícula e maior potencial quando comparados aos na matrix de PVOH.

Nesse estudo, outra abordagem que foi analisada para explicar a interação dos polímeros/fármacos foi através da espectroscopia Raman. Conforme dados da literatura, bandas acima de 2700 cm^{-1} correspondem a

presença de grupos carbonílicos no fármaco AND, importantes para a atividade antifúngica (Visser & Van der Maas, 1978). De fato, para o polímero PVOH combinado à AND foi verificado a presença de C=C quanto a de grupos carbonílicos. Em relação ao espectro do sistema PDDA/AND pode-se verificar a modificação das bandas em relação ao espectro das moléculas puras. Esses dados corroboram com a microscopia óptica demonstrando que esse sistema apresentou a provável formação de um complexo pela interação fármaco/polímero. Assim, sugere-se que a AND não está dispersa na matriz polimérica (PDDA), tornando assim um sistema estável.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- As formulações de enxaguantes bucais contendo C₁₆MImCl e selenocianatos alílicos (**1-3**) apresentaram ampla atividade antibiofilme contra *Candida* spp. em concentrações muito baixas (50 µg/mL e 150 µg/mL, respectivamente).
- A atividade antibiofilme foi observada especialmente para a formulação contendo C₁₆MImCl na ausência de sorbato de potássio (F2).
- A atividade antibiofilme foi observada especialmente para a formulação contendo selenocianatos alílicos na ausência ou presença de sorbato de potássio (S1, S1*, S3 e S3*).
- A formulação F2 causou alterações morfológicas e danos nas células sésseis na resina acrílica e, ao mesmo tempo, foi considerada hipoalergênica pelo ensaio HET-CAM. O mesmo efeito foi observado para as formulações contendo os selenocianatos alílicos **1-3**.
- Este fato indica fortemente o C₁₆MImCl e os selenocianatos alílicos (**1-3**) potentes e seguros como agentes antifúngicos e antibiofilmes para o desenvolvimento de formulações de enxaguantes bucais.
- Seis antifúngicos (KTZ, ITR, CP, C₁₆MImCl, AND e AMB) apresentaram seu efeito antifúngico potencializado quando associado ao polímero catiônico (PDDA).
- Como o polímero PDDA tem atividade intrinsecamente antifúngica, as atividades individuais associadas ao sinergismo de mecanismos antifúngicos produziram ações amplas e sistemas efetivos.
- Embora o PVOH seja um polímero neutro e não-ativo, poderia aumentar consideravelmente a eficácia de quatro dos seis fármacos testados, a saber, KTZ, ITR, C₁₆MImCl e AND, mostrando também ampla atividade antifúngica contra *Candida* spp. Em alguns casos, em concentrações muito baixas quando comparadas aos fármacos puros.

- Verificou-se mudança no potencial zeta, tamanho de partícula e estrutura do fármaco/polímero indicando a possível formação de um complexo estável;

- Muitos desses fármacos estão sob uso comercial por décadas e já apresentam uma ampla gama de susceptibilidade em sua composição pura, portanto, em seu estado associado (polímero/fármaco), os resultados obtidos neste trabalho evidenciam pela primeira vez fortes candidatos para a aplicação em várias áreas biomédicas, ativando o uso de uma série inteira de fármacos antifúngicos de diferentes classes.

8. PERSPECTIVAS

Verificar a estabilidade, controle de qualidade físico-química e microbiológica das formulações de enxaguantes bucais desenvolvidas;

Dar continuidade aos estudos polímero/fármaco, avaliando a combinação entre polímero e fármaco (interação, dispersão e morfologia) através de diferentes técnicas como Microscopia Óptica, espectroscopias Raman e FTIR, RMN e MALDI-TOF;

Avaliar o risco potencial de toxicidade em células de leucócitos humanos para obter uma melhor compreensão do uso potencial das associações polímero/fármaco.

9. REFERÊNCIAS

Alatorre-Meda M, Taboada P, Krajewska B, Willemeit M, Deml A, Klösel R, Rodríguez JR. 2010. DNA-poly(diallyldimethylammonium chloride) complexation and transfection efficiency. *J Phys Chem B*. 114(29):9356-66. doi: 10.1021/jp1016856.

Al-Fouzan AF, Al-Mejrad LA, Albarrag AM. 2017. Adherence of *Candida* to complete denture surfaces *in vitro*: A comparison of conventional and CAD/CAM complete dentures. *J Adv Prosthodont*. 9(5):402-408. doi: 10.4047/jap.2017.9.5.402. Epub 2017 Oct 16.

Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran L, Barrow D, Barros S, Preisser J, Loewy ZG, Gendreau L, Offenbacher S. 2013. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow, and dry mouth. *J Prosthodont*. 22(1):13-22.

American Chemical Society. International Year of Chemistry 2011: Activities Report of the American Chemical Society (ACS, 2011); available at go.nature.com/1tbzmxn.

Anderson JB. 2005. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol*. 3(7):547-56.

Arendrup MC. 2010. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 16(5):445-52. doi: 10.1097/MCC.0b013e32833e84d2.

Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, Diaz KA, Hisao GS, Tuttle MD, Nieuwkoop AJ, Comellas G, Maryum N, Wang S, Uno BE, Wildeman EL, Gonen T, Rienstra CM, Burke MD. 2014. *Nat Chem Biol*. 10(5):400-6. doi: 10.1038/nchembio.1496. Epub 2014 Mar 30.

Arnaud RR, Soares MSM, Dos Santos MGC, Dos Santos RC. 2012. Estomatite Protética: Prevalência e Correlação Com Idade e Gênero. *Rev. Bras Ciên Saúde*. 16(1):59-62.

Asadoorian, J. 2006. CDHA position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. *CJDH*. 40(4):01-1.

Avrella D, Goulart LS. 2008. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. *RBAC*, Rio de

Janeiro. 40:205-207.

Barbedo LS, Sgarbi DBG. 2010. Candidíase. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 22(1):22.

Basavaiah D, Reddy BS, Badsara SS. 2010. Recent contributions from the Baylis-Hillman reaction to organic chemistry. *Chem Ver*. 110(9):5447–5674.

Batista BG, Dalla Lana DF, Silveira GP, Sa´ MM, Ferreira M, Russo TVC, Canto RFS, Barbosa FAR, Braga AL, Kaminski TFA, de Oliveira LFS, Machado MM, Lopes W, Vainstein MH, Teixeira ML, Andrade SF, Fuentefria AM. 2017. Allylic Selenocyanates as New Agents to Combat *Fusarium* Species Involved with Human Infections. *Medicinal Chemistry & Drug Discovery*. 2(35):11926–11932. DOI: 10.1002/slct.201702338.

Benhamou RI, Bibi M, Steinbuch KB, Engel H, Levin M, Roichman Y, Berman J, Fridman M. 2017. Real-Time Imaging of the Azole Class of Antifungal Drugs in Live *Candida* Cells. *ACS Chem Biol*. 12(7):1769-1777. doi: 10.1021/acscchembio.7b00339. Epub 2017 May 12.

Bennet D, Kim S. *Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery*. Chapter 8. Intech. <http://dx.doi.org/10.5772/58422>. 2014.

Bergamo VZ, Donato RK, Dalla Lana DF, Donato KJZ, Ortega GG, Schrekker HS, Fuentefria AM. 2015a. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. *Lett Appl Microbiol* 60(1):66–71.

Bergamo VZ, Balbuena EA, Hatwig C, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato RK, Schrekker HS, Fuentefria AM. 2015b. 1-n-Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. *Lett Appl Microbiol* 61(5):504–510.

Bergamo VZ, Donato RK, Nemitz MC, Acasigua GA, Selukar BS, Lopes W, et al. Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation. 2016. *J Appl Microbiol*. 121(6):1558-1567. doi: 10.1111/jam.13283. Epub 2016 Nov 3.

Bertolini MM, Portela MB, Curvelo JAR, Soares RMA, Lourenco EJV, Telles DM. 2014. Resins-based denture soft lining materials modified by

chlorhexidine salt incorporation: an *in vitro* analysis of antifungal activity, drug release and hardness. *Dent Mater.* 30(8):793-8.

Bianchi CM, Bianchi HA, Tadano T, Paula CR, Hoffmann-Santos HD, Leite Jr DP, Hahn RC. 2016. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 58:17.

Borghi E. 2015. New strategic insights into managing fungal biofilms. *Front Microbiol.* 6;6:1077. doi: 10.3389/fmicb.2015.01077. eCollection 2015.

Brandt ME, Lockhart SR. 2012. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. *Curr Fungal Infect Rep.* 6(3):170–177.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SBBRASIL 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, p. 92, 2011.

Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. 2012. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman.** 12. ed. Porto Alegre: AMGH. 2112p.

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

Bueno MG, Urban VM, Barberio GS, Silva WJ, Porto VC, Pinto LR, Neppelenbroek KH. 2015. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* Biofilm. *Oral Dis.* 21(1):57-65.

Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio MT. 2006. Mouthwashes: antimicrobial efficacy assessment in commercially available products. *Rev Inst Adolfo Lutz,* 65(1):40-45.

Campoy S, Adrio JL. 2017. Antifungals. *Biochem Pharmacol* 133, 86–96. doi: 10.1016/j.bcp.2016.11.019. Epub 2016 Nov 21.

Candido RC, Tolo MR, Franceschini SA, Garcia FR, Minto EC. 1998. *In vitro* activity of antimycotic agents determined by E-test method against vaginal *Candida* species. *Mycopathologia.* 144(1):15–20.

Carson L, Chau PKW, Earle MJ, Gilea MA, Gilmore BF, Gorman SP, McCann MT, Seddon KR. 2009. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chem* 11, 492–497.

Cavalcanti AL, Meneses RO, Da Silva KF, Sá, SCVL, Almeida LFD, Castro RD. 2009. Atividade antifúngica *in vitro* de enxaguatórios bucais sobre *Candida* spp. Rev Odontol UNESP. 38(5): 313–317.

Chandra J, Mukherjee P. 2015. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. Microbiol Spectr. 3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015.

Chang Y, Yu S, Heitman J, Wellington M, Chen Y. 2017. New facets of antifungal therapy. Virulence 8(2):222–236.

Chen S, Yuan L, Li Q, Li J, Zhu X, Jiang Y, Sha O, Yang X, Xin J, Wang J, Stadler FJ, Huang P. 2016. Durable Antibacterial and Nonfouling Cotton Textiles with Enhanced Comfort via Zwitterionic Sulfopropylbetaine Coating. Small. 12(26):3516-21. doi: 10.1002/smll.201600587. Epub 2016 May 23.

Choi H, Kim KJ, Lee DG. 2017. Antifungal activity of the cationic antimicrobial polymer-polyhexamethylene guanidine hydrochloride and its mode of action. Fungal Biol. 121(1):53-60. doi: 10.1016/j.funbio.2016.09.001. Epub 2016 Sep 10.

Chung PY, Toh YS. 2014. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. Pathog Dis. 70(3):231-9. doi: 10.1111/2049-632X.12141. Epub 2014 Feb 24.

Cierech M, Kolenda A, Grudniak AM, Wojnarowicz J, Woźniak B, Gołaś M, Swoboda-Kopeć E, Łojkowski W, Mierzwińska-Nastalska E. 2016. Significance of polymethylmethacrylate (PMMA) modification by zinc oxide nanoparticles for fungal biofilm formation. Int J Pharm. 20;510(1):323-35. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.052. Epub 2016 Jun 21.

Cisilotto J, Ferreira M, Filippin-Monteiro FB, Bortoluzzi AJ, Sá MM, Creczynski-Pasa TB. 2015. Isothiouonium Salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells, Anticancer Agents Med Chem. 15(3):353-362.

Clark TA, Hajjeh RA. 2002. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. Curr Opin Infect Dis. 15(3):569-574.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard

– Third Edition. CLSI Document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-S4. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012.

Cochis A, Fracchia L, Martinotti MG, Rimondini L. 2012. Biosurfactants prevent *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 113(6):755-61. doi: 10.1016/j.oooo.2011.11.004. Epub 2012 Mar 3.

Colombo A, Garnica M, Camargo L, Da Cunha C, Bandeira A, Borghi D, Campos T, Senna AL, Valias Didier ME, Dias VC, Nucci M. 2013. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol.* 51(1):38-44.

Compagnoni MA, Pero AC, Ramos SMM, Marra J, Paleari AG, Rodriguez LS. 2014. Antimicrobial activity and surface properties of an acrylic resin containing a biocide polymer. *Gerodontology.* 31(3):220-6.

Corbin A, Pitts B, Parker A, Stewart PS. 2011. Antimicrobial penetration and efficacy in *in vitro* oral biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(7):3338-3344.

Corte-Real I, Figueiral M, Reis Campos J. 2011. As doenças orais no idoso – Considerações gerais, *Rev Port Estomatol Med Cir Maxilofac.* 52(3):175-180.

Costa CR, Hasimoto e Souza LK, Ataídes FS, Ferri PH, Costa MP, Fernandes OeF, Silva MRR. 2011. Molecular analysis and dimorphism of azole-susceptible and resistant *Candida albicans* isolates. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44(6):740-4.

Cowen LE. 2008. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol.* 6(3):187-98. doi: 10.1038/nrmicro1835.

Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. 2014. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect.*

10;5(7):a019752. doi: 10.1101/cshperspect.a019752.

Cuéllar-Cruz M, Vega-González A, Mendoza-Novelo B, López-Romero E, Ruiz-Baca E, Quintanar-Escorza MA, Villagómez-Castro JC. 2012. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 10:2513-27. Epub 2012 May 12.

Cruz MC, González AV, Novelo BM, Romero E.L, Baca ER, Escorza MAQ, Castro JCV. 2012. The effect of biomaterials and antifungal on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 31: 2513-2527.

Dalla Lana DF, Donato RK, Bündchen C, Guez CM, Bergamo VZ, de Oliveira LF, Machado MM, Schrekker HS, Fuentefria AM. 2015. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. *J Appl Microbiol*. 119(2):377-88. doi: 10.1111/jam.12862. Epub 2015 Jun 29.

Dananjaya SHS, Kumar RS, Yang M, Nikapitiya C, Lee J, De Zoysa M. 2017. Synthesis, characterization of ZnO-chitosan nanocomposites and evaluation of its antifungal activity against pathogenic *Candida albicans*. *Int J Biol Macromol*. S0141-8130(17)32834-9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.046. [Epub ahead of print].

Delaloye J, Calandra T. 2014. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*. 5(1):161–169.

De Prijck K, Smet ND, Coenye T, Schacht E, J Nelis H. 2010. Prevention of *Candida albicans* biofilm formation by covalently bound dimethylaminoethyl methacrylate and polyethylenimine. *Mycopathologia*. 170(4):213-21.

Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. 2009. *Candida*. In: Anaissie, EJ, Mcginnis, MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. 2nd ed., Amsterdam: Elsevier.

Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. 2001. *Candida* associated denture stomatitis. *Folia Microbiol*.46:443–6.

Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo CE, Vergani CE, Bagnato VS. 2011. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*.

54(2)123–130.

Dupont J, Consorti CS, Spencer J. 2000. Room Temperature Molten Salts: Neoteric "Green" Solvents for Chemical Reactions and Processes. *J Braz Chem Soc*, 11(4):337-344.

Eichenbaum G, Zhou J, De Smedt A, De Jonghe S, Looszova A, Arien T, Van Goethem F, Vervoort I, Shukla U, Lammens L. 2013. Methods to evaluate and improve the injection site tolerability of intravenous formulations prior to first-in-human testing. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 68(3):394-406. doi: 10.1016/j.vascn.2013.08.002. Epub 2013 Aug 8.

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

Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A, Moalic E, Le Flohic AM, Brangerd B. 2006. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *J Med Microbiol*. 55(Pt 2):223-8.

Fanning S, Mitchell AP. 2012. Fungal biofilms. *Plos Pathogens*, 8(4):1–4.

Fardin RF, Andrade IP, Xavier KBC, Nunes APF. 2011. Avaliação *in vitro* das diferentes concentrações de clorexidina no controle da placa dental bacteriana. *Rev Bras Pesq Saúde*. 13(2):37-42.

Ferreira M, Fernandes L, Sá MM. 2009. A highly efficient and general method for the preparation of (Z)-allylic bromides derived from Morita-Baylis-Hillman adducts. *J Braz Chem Soc*. 20(3):564:568-20.

Figueiral MH, Fonseca P, Lopes MM, Pinto E, Pereira-Leite T, Sampaio-Maia B. 2015. Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral *Candida albicans* Susceptibility Profile and Genotypic Variability. *Open Dent J*. 9: 46–51.

Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. 2003. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. 24(7):1121-31.

Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A,

Dimopoulos G. 2013. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clin Interv Aging* 8, 1199–1208.

Fortún J, Gioia F. 2017. Invasive candidiasis in the neutropenic patient. *Rev Esp Quimioter. Suppl* 1:22-25.

Fu J, Wei P, Zhao C, He C, Yan Z, Hua H. 2014. *In vitro* antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes. *Oral Dis* 20(8):815–820.

Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade SF. 2018. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett Appl Microbiol.* 66(1):2-13. doi: 10.1111/lam.12820. Epub 2017 Dec 11.

Garcia-Cuesta, C.; Sarrion-Perez, M.G.; Bagan, J.V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J. Clin. Exp. Dent.* 2014, 6, 576–582.

Gauch LMR, Pedrosa SS, Silveira-Gomes F, Esteves RA, Marques-da-Silva SH. 2017. Isolation of *Candida* spp. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. *Braz J Microbiol.* S1517-8382(17)30700-1. doi: 10.1016/j.bjm.2017.07.001. [Epub ahead of print].

Gendreau L, Loewy ZG. 2011. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011;20(4):251-60. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x.

Giannini PJ, Shetty KV. Diagnosis and management of oral candidiasis. *Otolaryngol Clin North Am.* 44(1):231-40, vii. doi: 10.1016/j.otc.2010.09.010.

Giles C, Lamont-Friedrich SJ, Michl TD, Griesser HJ, Coad BR. 2017. The importance of fungal pathogens and antifungal coatings in medical device infections. *Biotechnol Adv.* S0734-9750(17)30152-0. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.11.010. [Epub ahead of print].

Gonzales FP, Maisch T. 2012. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol.* 116(1):1-10. doi: 10.1016/j.funbio.2011.10.001. Epub 2011 Oct 19.

Gual-Vaques P, Jane-Salas E, Egido-Moreno S, Ayuso-Montero R,

Mari-Roig A, Lopez-Lopez J. 2017. Inflammatory papillary hyperplasia: a systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 22:e36-42.

Guarro J. 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30(1):33–39.

Gulati M, Nobile CJ. 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 18(5):310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002. Epub 2016 Jan 22.

Gulshan K, Moye-rowley WS. 2007. Multidrug resistance in fungi. *Eukaryotic Cell*, 6(11):1933-1942, 2007.

Guram AS. 1993. Synthesis of Allylic Selenocyanates via Electrophilic Cyanoselenation of Allylic Silanes. *Synlett*. 1993; 259-264.

Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA. 2008. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 6(4):290–303.

Harriott MM, Noverr MC. 2011. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol*. 19(11):557–563.

Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Rabiei M, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. 2007. Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 73(15):4940–9.

Hegab HM, ElMekawy A, Zou L, Mulcahy D, Saint CP, Ginic-Markovic M. 2016. The controversial antibacterial activity of graphene-based materials. *Carbon* 105:362–376.

Hiller E, Zavrel M, Hauser N. 2011. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. *Int J of Med Microbiol*. 301(5):384-380.

Holley A, Dulhunty J, Blot S, Lipman J, Lobo S, Dancer C, Rello J, Dimopoulos G. 2009. Temporal trends, risk factors and outcomes in *albicans* and non-*albicans* candidaemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 33(6):554.e1-7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.035.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative

Methods (ICCVMA). 2010 The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Research Triangle Park: National Toxicology Program.

Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP. 2006. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* 35, 481–491.

Kanafani ZA, Perfect JR. 2008. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 46(1):120-8.

Kiedrowski MR, Horswill AR. 2011. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Acadademy of Sciences.* 1241:104-21.

Krcmery V, Barnes AJ. 2002. Non- *albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 50(4):243-260.

LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. 2006. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50(11):3839-46. Epub 2006 Aug 21.

Lazarin AA, Zamperini CA, Vergani CE, Wady AF, Giampaolo ET, Machado AL. 2014. *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an *in vitro* study. *Gerodontology* 31:25-33.

Lee T, Sa Hoon Min, Minsu Gu, Yun Kyung Jung, Wonoh Lee, Jea Uk Lee, Dong Gi Seong, Byeong-Su Kim. 2015. Layer-by-Layer Assembly for Graphene-Based Multilayer Nanocomposites: Synthesis and Applications. *Chem. Mater.* 27(11):3785–3796.

Lemos, MMC, de Miranda JL, MSG dos Santos Souza. 2003. Clinic, microbiologic and histopathologic study of the denture stomatitis. *Revista Brasileira de Patologia Oral.* (2):1;3-10.

Leroy O, Mira JP, Montravers P, Gangneux JP, Lortholary O. 2010. Comparison of *albicans* vs. non-*albicans* candidemia in French intensive care units. *Crit Care.*14(3):R98. doi: 10.1186/cc9033. Epub 2010 May 27.

Lewis RE. 2011. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. Mayo

Clin Proc. 86(8):805–817.

Li G, Zhao H, Hong J, Quan K, Yuan Q, Wang X. 2017. Antifungal graphene oxide-borneol composite. *Colloids Surf B Biointerfaces*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 160:220-227. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.023. Epub 2017 Sep 14.

Lima-Neto RG, Beltrão EI, Oliveira PC, Neves RP. 2011. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* 54(1):23-9.

Lu J, Wang X and Xiao C. 2008. Preparation and characterization of konjac glucomannan/poly(diallyldimethylammonium chloride) antibacterial blend films. *Carbohydr. Polym.* 73(3):427-437.

Lukowiak A, Kedziora A, Strek W. 2016. Antimicrobial graphene family materials: Progress, advances, hopes and fears. *Adv. Colloid Interface Sci.* 236:101–112. doi: 10.1016/j.cis.2016.08.002. Epub 2016 Aug 20.

Lund RG, da Silva Nascente P, Etges A, Ribeiro GA, Rosalen PL, Del Pino FA. 2010. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* spp. and prevalence of variables associated to chronic atrophic candidiasis. *Mycoses*. 53(3):232-8. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01697.x. Epub 2009 Mar 7.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2010. **Microbiologia de Brock**. Artmed 12° Edição. 1160 p.

Marinoski J, Bokor-Bratic M, Cankovic M. 2014. Is denture stomatitis always related with candida infection? A case control study. *Med Glas (Zenica)* 11(2):379-384.

Martins JS, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NS, Rossoni, RD, Colombo CED. 2011. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 11(1):71-77.

Martins N, Ferreira ICFR, Barros L, Silva S, Henriques M. 2014. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia.* 177(5-6):223–240.

Martori E, Ayuso-Montero R, Willaert E, Vinas M, Peraire M, Martinez-Gomis J. 2017. Status of removable dentures and relationship with oral *Candida*-

associated factors in a geriatric population in Catalonia. *J Prosthodont.* 26(5):370-375.

Mathé L, Van Dijck P. 2013. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet.* 59(4):251-64. doi: 10.1007/s00294-013-0400-3. Epub 2013 Aug 25.

Méan M, Marchetti O, Calandra T. 2008. Bench-to bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care.* 12(1):204.

Meiller TF, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, Depaola LG, Baqui AA, Falkler WA Jr. 2001. *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91(6):663-70.

Melo LD, Carmona-Ribeiro AM. 2012. Fungicidal Nanoparticles of Low Toxicity from Cationic Lipid and Polyelectrolytes. *Nanotech.* 3:350-353.

Melo IA, Guerra RC. 2014. Candidíase oral: um enfoque sobre a estomatite por prótese. *Salusvita.* 33(3):389-414.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 11(2):142–51.

Miceli MH, Kauffman CA. 2015. Isavuconazole: A new broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis.* 61(10):1558-65. doi: 10.1093/CID/CIV571. epub 2015 jul 15.

Migowski, P, Dupont J. 2007. Catalytic applications of metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids. *Chem Eur J.* 13(1):32-39.

Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. 2011. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: *in vitro* study. *Photomed Laser Surg.* 29(12):827-33.

Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, De Camargo ER, Ruvolo Filho AC, Barbosa DB. 2012. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont.* 21(1): 7-15.

Moreira ACA, Pereira MHQ, Porto MR, da Rocha LAP, Nascimento BC, Andrade PM. 2009. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. *Braz J Med Biol Res* 8(2):153–161.

Motoa G, Muñoz JS, Oñate J, Pallares CJ, Hernández C, Villegas MV.

2017. Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. *Rev Iberoam Micol.* 34(1):17-22. doi: 10.1016/j.riam.2016.02.006. Epub 2016 Oct 31.

Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. 2003. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* 2003;71:4333e40.

Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R. 2012. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31(7):1399–1412.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D. 2007. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(2):510-20. Epub 2006 Nov 27.

Nett JE, Brooks EG, Olcoz JC, Sanchez H, Zarnowski R, Marchillo K, Andes DR. 2014. Rat indwelling urinary catheter model of *Candida albicans* biofilm infection. *Infect Immun.* 82(12):4931-4940.

Newton A. 1962. Denture Sore Mouth – A Possible Etiology. *Br Dent J.* 112(9):357-60.

Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR, Johnson AD. 2012. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.*148(1-2):126-38.

Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol* 2015;69:71e92.

Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104(12): 6255-85.

Nosengo N. 2016. Can you teach old drugs new tricks? *Nature.* 6;534(7607):314-6. doi: 10.1038/534314a.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010;51(5):561-70.

Oliveira RC, Brum SC, Oliveira RS, Goyatá F dos Reis. 2007. Aspectos clínicos relacionados à estomatite protética. *Internacional Journal of Dentistry*, Recife, abril/jun 2007, 6(2):51-54.

Paiva LCA, Ribeiro RA, Pereira JV, Oliveira NMC. 2009 Clinical and laboratorial evaluation of *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw) gel on oral candidiasis. *Rev. bras. farmacogn.* 19(2A):423-428.

Paleari AG, Marra J, Pero AC, Rodriguez LS, RuvoloFilho A, Compagnoni MA. 2011. Effect of incorporation of 2-tert-butylaminoethyl methacrylate on flexural strength of a denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 19(3):195-9.

Papadiochou S, Emmanouil I, Papadiochos I. 2015. Denture adhesives: a systematic review. *J Prosthet Dent.* 113(5):391-397.e2. doi: 10.1016/j.prosdent.2014.11.001. Epub 2015 Mar 4.

Pea F, Lewis RE. 2018. Overview of antifungal dosing in invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 73(suppl_1):i33-i43. doi: 10.1093/jac/dkx447.

Pendleton JN, Gilmore BF. 2015. The antimicrobial potential of ionic liquids: A source of chemical diversity for infection and biofilm control. *Int J Antimicrob Agents.* 46(2):131-139. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.016. Epub 2015 Mar 30.

Pereira G, Muller P, Szeszs M, Levin A, Melhem M. 2010. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Med Mycol.* 48(6), p. 839-842. doi: 10.3109/13693780903580121.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa ACBP, Machado AKS, Junqueira JC, Jorge AOC. 2011. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. *Lasers Med.* 26(3):341-48. doi: 10.1007/s10103-010-0852-3. Epub 2010 Nov 11.

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

Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*, v. 36(1):1-53. doi: 10.3109/10408410903241444.

Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Jones RN, Lockhart SR, Martin-Mazuelos E, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pappas P, Pelaez T, Peman J, Rex J, Szeszs MW. 2012 Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol*. 50(6):2040–6. doi: 10.1128/JCM.00248-12.

Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. 2015. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82(4):303-13. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.008. Epub 2015 Apr 29.

Pham CD, Iqbal N, Bolden C, Kuykendall R, Harrison L, Farley M, Schaffner W, Beldavs ZG, Chiller TM, Park BJ, Cleveland AA, Lockhart SR. 2014. Role of FKS Mutations in *Candida glabrata*: MIC Values, Echinocandin Resistance, and Multidrug Resistance. *Antimicrob Agents Chemoter*. 58(8):4690-4696.

Pianalto KM, Alspaugh JA. 2016. New horizons in antifungal therapy. *J Fungi*. 2(4):1–24.

Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot JL. 2017. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *J Fungi (Basel)*. 3(1). pii: 14. doi: 10.3390/jof3010014. Epub 2017 Mar 8.

Pietrokovski Y, Nisimov I, Kesler-Shvero D, Zaltsman N, Beyth N. 2016. Anti-bacterial effect of composite resin foundation material incorporating quaternary ammonium polyethyleneimine nanoparticles. *J Prosthet Dent*. 116(4):603-9.

Pinto TMS, Neves ACC, Leão MVP, Jorge AOC. 2008. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. in complete denture wearers. *J Appl Oral Sci.* 16(6):385-90.

Prakash B, Shekar M, Maiti B, Karunasagar I, Padiyath S. 2015. Prevalence of *Candida* spp. among healthy denture and nondenture wearers with respect to hygiene and age. *J Indian Prosthodont Soc.* 15(1):29-32. doi: 10.4103/0972-4052.155041.

Pranantyo D, Xu LQ, Kang ET, Mya MK, Chan-Park MB. 2016. Conjugation of Polyphosphoester and Antimicrobial Peptide for Enhanced Bactericidal Activity and Biocompatibility. *Biomacromolecules.* 2016 Dec 12;17(12):4037-4044. Epub 2016 Nov 22.

Puri G, Berzins DW, Dhuru VB, Raj PA, Rambhia SK, Dhir G, Dentino AR. 2008. Effect of phosphate group addition on the properties of denture base resins. *J Prosthet Dent.* 100(4):302-8. doi: 10.1016/S0022-3913(08)60210-3.

Quindós G. 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 31(1):42-8. doi: 10.1016/j.riam.2013.10.001. Epub 2013 Nov 19.

Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. 2001. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 9:2475–2479.

Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 49(6):973-80.

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

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Ribot JLL. 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell.* 4(4): 633-638.

Ramage G, Jose A, Coco B, Rajendran R, Rautemaa R, Murray C, Lappin DF, Bagg J. 2011. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 111(4):456-60. doi:

10.1016/j.tripleo.2010.10.043.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. 2012. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.* 2012:528521. [https://doi: 10.1155/2012/528521](https://doi.org/10.1155/2012/528521). Epub 2012 Feb 8.

Ramage G, Robertson SN, Williams C. 2014. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 43(2):114-120.

Regis RR, Zanini AP, Della Vecchia MP, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO, De Souza RF. 2011. Physical properties of an acrylic resin after incorporation of an antimicrobial monomer. *J Prosthodont.* 20(5):372-9.

Riague EH, Guillemin J-C. 2002. Synthesis and characterization of allylic and propargylic selenols. *Organometallics.* 21(1):68-73.

Riduan ST, Zhang Y. 2013. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. *Chem Soc Rev.* 42(23):9055-9070.

Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E. 2001. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* 39(7):2513-7.

Sá MM, Ferreira M, Lima ES, Santos I, Orlandi PP, Fernandes L. 2014. Antimicrobial activity of allylic thiocyanates derived from the Morita-Baylis-Hillman reaction. *Braz J Microbiol* 45:807:812.

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

Salim N, Silikas N, Satterthwaite JD, Moore C, Ramage G, Rautemaa R. 2013. Chlorhexidine-impregnated PEM/THFM polymer exhibits superior activity to fluconazole-impregnated polymer against *Candida albicans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents.* 41(2):193-6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.09.006. Epub 2012 Nov 3.

Salwiczek M, Qu Y, Gardiner J, Strugnell RA, Lithgow T, Mclean KL, Thissen H. 2014. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends Biotechnol.* 32: 82-90.

Sankar V, Hearnden V, Hull K, Juras DV, Greenberg MS, Kerr AR,

Lockhart PB, Patton LL, Porter S, Thornhill M. 2011. Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. *Oral Dis.* 17 Suppl 1:73-84. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01793.x.

Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl, C. 2015. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 58(2):2–13.

Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, Vergani CE. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Jun;111(6):726-33. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.02.033.

Santagata G, Valerio F, Cimmino A, Dal Poggetto G, Masi M, Di Biase M, Malinconico M, Lavermicocca P, Evidente A. 2017. Chemico-physical and antifungal properties of poly(butylene succinate)/cavoxin blend: Study of a novel bioactive polymeric based system. *Eur. Polym. J.* 94:230-247.

Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 62(Pt 1):10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0. Epub 2012 Nov 22.

Schrekker HS, Silva DO, Gelesky MA, Stracke MP, Schrekker CML, Gonçalves RS, Dupont J. 2008. Preparation, cation-anion interactions and physicochemical properties of ether-functionalized imidazolium ionic liquids. *J Braz Chem Soc.* 19(3):426-433.

Schrekker HS, Donato RK, Fuentefria AM, Bergamo V, Oliveira LF, Machado MM. 2013. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. *Med Chem Comm.* 4:1457-1460.

Sesma N, Morimoto S. 2011. Estomatite protética: etiologia, tratamento e aspectos clínicos. *Journal of Biodentistry and Biomaterials.* (2):24-9.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2011. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* 19(5):241–247.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 36(2):288–305.

Silveira GP, Ferreira M, Fernandes L, Moraski GC, Cho S, Hwang C, Franzblau SG, Sá MM. 2012. Allylic thiocyanates as a new class of antitubercular agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 22:6486-6489.

Silveira GP, Andrade SF, Batista BG, Fuentefria AM, Braga AL, Canto RF, Barbosa FR, Ferreira M, Russo TVC, Sá MM. 2017. Selenocianato alílico, processo de obtenção e usos do mesmo e composição de enxaguatório buccal. *Br Patent 1020170151840.*

Shi Y, Liu M, Wang K, Deng F, Wan Q, Huang Q, Fu L, Zhang X, Wei Y. Bioinspired preparation of thermo-responsive graphene oxide nanocomposites in an aqueous solution. *Polym Chem.* 6 (32) 5876–5883.

Shim JY, Yim SB, Chung JH, Hong KS. 2012. Antiplaque and antigingivitis effects of a mouthrinse containing cetylpyridinium chloride, triclosan and dipotassium glycyrrhizinate. *J Periodontal Implant Sci.* 42(2):33-8. doi: 10.5051/jpis.2012.42.2.33. Epub 2012 Apr 30.

Shinawi LA. 2017. Effect of denture cleaning on abrasion resistance and surface topography of polymerized CAD CAM acrylic resin denture base. *Electron Physician.* 9(5):4281–4288. doi: 10.19082/4281.

Smiglak M, Pringle JM, Lu X, Han L, Zhang S, Gao H, Macfarlane DR, Rogers RD. 2014. Ionic liquids for energy, materials, and medicine. *Chem Commun-RSC.* 50(66):9228-50. doi: 10.1039/c4cc02021a.

Song R, Jiao X, Lin L. 2011. Improvement of mechanical and antimicrobial properties of denture base resin by nano-titanium dioxide and nano-silicon dioxide particles. *Pigment & Resin Technology.* 40:393-8.

Sood A, Granick MS, Tomaselli NL. 2014. Wound dressings and comparative effectiveness data. *Adv Wound Care.* 3(8):511–29.

Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka FV. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of

biofilm production by *staphylococci*. *APMIS* 115(8):891–899.

Szunerits S, R. Boukherroub. 2016. Antibacterial activity of graphene-based materials. *J Mater Chem. B.* 4:6892–6912.

Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MGPMS, Tomé JPC, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Cunha A, Gomes NCM, Alves E, Almeida A. 2010. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Mar Drugs.* 8(1):91-105.

Thomas E. 2011. Efficacy of two commonly available mouth rinses used as preprocedural rinses in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 29(2):113-116.

Timofeeva L, Kleshcheva N. 2011. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89(3):475–92.

Tobudic S, Kratzer C, Presterl, E. 2012. Azole-resistant *Candida* spp. -emerging pathogens? *Mycoses* 5:24-32.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2012. **Microbiologia**. Artmed 10^o Edição. 934 p.

Uludamar A, Osyesil AG, Ozkan YK. 2011. Clinical and microbiological efficacy of three different treatment methods in the management of denture stomatitis. *Gerodontology.* 28(2):104-10. doi: 10.1111/j.1741-2358.2009.00354.x. Epub 2010 Jun 2.

Vediyappan G, Rossignol T, D'Enfert C. 2010. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(5):2096-111. doi: 10.1128/AAC.01638-09. Epub 2010 Mar 1.

Villanova JCO, Oréfica R L. 2010. Aplicações farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros.* 20(1):51-64.

Visser T, Van der Maas J H. 1978. Systematic Interpretation of Raman Spectra of Organic Compounds III-Carbonyl Compounds. *J. J. of Raman Spectroscopy.* 7(3):125-129.

Wang C, Zolotarskaya OY, Nair SS, Ehrhardt CJ, Ohmanş DE, Wynne KJ, Yadavalli VK. 2016. Real-Time Observation of Antimicrobial

Polycation Effects on *Escherichia coli*: Adapting the Carpet Model for Membrane Disruption to Quaternary Copolyoxetanes. *Langmuir*. 32(12):2975–2984. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b04247.

Weerasekera MM, Jayarathna TA, Wijesinghe GK, Gunasekara CP, Fernando N, Kottegoda N, Samaranayake LP. 2017. The Effect of Nutritive and Non-nutritive sweeteners on the Growth, Adhesion and Biofilm Formation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Med Princ Pract*. doi: 10.1159/000484718. [Epub ahead of print].

Wen J, Jiang F, Yeh CK, Sun Y. 2016. Controlling fungal biofilms with functional drug delivery denture biomaterials. *Colloids Surf B* 140:19–27.

White DJ. 2005. An alcohol-free therapeutic mouthrinse with cetylpyridinium chloride (CPC)--the latest advance in preventive care: Crest Pro-Health Rinse. *Am J Dent*. 18 Spec No:3A-8A.

Wiederhold NP. 2017. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist*. 10:249-259. doi: 10.2147/IDR.S124918. eCollection 2017.

Williams DW, Jordan RP, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, Lewis MA. 2013. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol*. 5. doi: 10.3402/jom.v5i0.22434.

Witzel AL, Pires Mde F, de Carli ML, Rabelo GD, Nunes TB, da Silveira FR. *Candida albicans* isolation from buccal mucosa of patients with HIV wearing removable dental prostheses. *Int J Prosthodont*. 25(2):127-31.

Yan N, Capezzuto F, Buonocore GG, Lavorgna M, Xia H, Ambrosio L. 2015. Gas Barrier Hybrid Coatings by Assembling of Novel Poly Vinyl Alcohol and Reduced Graphene Oxide Layers through Crosslinking with Zirconium Adducts. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7(40):22678-85. doi: 10.1021/acsami.5b07529. Epub 2015 Oct 2.

Yapar N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 10:95-105. doi: 10.2147/TCRM.S40160. eCollection 2014.

Zambrano LJM, Escribano P, Bouza E, Guinea J. 2014. Production of biofilm by *Candida* and *non-Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points.

Int J Med Microbiol. 304(8):1192-8. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.08.012. Epub 2014 Sep 1.

Zhang X, Hu W, Li J, Tao L, Wei Y. 2012. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond. *Toxicol. Res.* 1:62–68.

Zhu J, Wang J, Hou J, Zhang Y, Liu J, Van der Bruggen B. 2017. Graphene-based antimicrobial polymeric membranes: a review. *J. Mater. Chem. A.* 5: 6776–6793.