

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Alexandre Ehrhardt

**CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO COM SAL IMIDAZÓLICO:
BIOMATERIAL FUNCIONALIZADO COM PROPRIEDADES
ANTIBIOFILME FÚNGICO**

Porto Alegre

2017

Alexandre Ehrhardt

**CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO COM SAL IMIDAZÓLICO:
BIOMATERIAL FUNCIONALIZADO COM PROPRIEDADES
ANTIBIOFILME FÚNGICO**

Trabalho de conclusão de curso de pós-graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Aurélio Donassollo

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Ehrhardt, Alexandre

Cimento de ionômero de vidro modificado com sal imidazólico: biomaterial funcionalizado com propriedades antibiofilme fúngico / Alexandre Ehrhardt. -- 2017.
62 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Puentefria.
Coorientador: Tiago Aurélio Donassollo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Biomateriais. 2. Antibiofilme fúngico. 3. Sais imidazólicos. 4. Cimento de ionômero de vidro. I. Puentefria, Alexandre Meneghello, orient. II. Donassollo, Tiago Aurélio, coorient. III. Título.

Alexandre Ehrhardt

**CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO COM SAL IMIDAZÓLICO:
BIOMATERIAL FUNCIONALIZADO COM PROPRIEDADES
ANTIBIOFILME FÚNGICO**

Trabalho de conclusão de curso de pós-graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: 27 de abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Angelo Luis Stapassoli Piato - UFRGS

Régis Adriel Zanette - UFRGS

Saulo Fernandes de Andrade - UFRGS

Alexandre Meneghello Fuentesfria (Orientador) - UFRGS

RESUMO

Os cimentos de ionômero de vidro são biomateriais constituídos de polímeros ácidos, vidro básico (ionizável) e água, sendo usados amplamente no campo odontológico, como materiais restauradores ou ainda como cimentadores de bandas ortodônticas. Estes compostos podem ser suscetíveis a formação de biofilmes por espécies de *Candida* na sua superfície em função da rugosidade associada a colonização fúngica do meio bucal. Pesquisas na área de desenvolvimento de biomateriais funcionais tem buscado desenvolver compostos de alta eficácia e baixa toxicidade que sejam capazes de inibir a formação de biofilmes sobre superfícies biológicas. Considerando a busca por novos biomateriais, foi desenvolvido um estudo ex vivo com o objetivo de modificar a estrutura de um cimento de ionômero de vidro comercialmente disponível (Ketac® Cem Easymix 3M) através da inserção do sal imidazólico cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazol comparado ao cloreto de cetilpiridínio para compor um novo composto com atividade antibiofilme. O sal imidazólico e o cloreto de cetilpiridínio foram acrescentados diretamente ao pó do ionômero de vidro na proporção de 10 ppm p/p. A partir desta adição inicial, foi realizada a reação de polimerização do ionômero, obtendo corpos de prova (CP) medindo 5 mm Ø x 3 mm h, os quais foram divididos em 03 grupos: CP₁, constituído do ionômero na formulação original (controle de crescimento de biofilme); CP₂, constituído do ionômero acrescido com o cloreto de cetilpiridínio (referência) e CP₃, constituído do ionômero acrescido do sal imidazólico. Foram testadas nove cepas de *Candida* não *albicans* resistentes aos antifúngicos usuais, sendo três cepas de *C. glabrata* (RL22, RL24 e RL25), três cepas de *C. tropicalis* (57A, 72A e 72P) e três cepas de *C. parapsilosis* (RL11, RL20 e RL32), todas depositadas no Laboratório de Micologia da UFRGS. Avaliou-se a resistência a deformação plástica pelo teste de microdureza; a atividade antibiofilme pela avaliação de inibição de crescimento na superfície dos CP por microscopia eletrônica de varredura e avaliação de hipoalergenicidade pelo teste da membrana cório-alantoide. O teste de microdureza não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os três grupos, com valor médio de 44.2 HV para o CP₁, 43.5 HV para o CP₂ e 43,1 HV para o CP₃. A avaliação da superfície dos CP através da análise de microscopia eletrônica demonstrou haver inibição completa da formação do biofilme de todas as cepas testadas. O teste da membrana cório-alantoide indicou que o ionômero de vidro na sua composição original, bem como acrescido dos dois compostos testados, demonstrou ser hipoalergênico. Considerando os dados apresentados, podemos concluir que a adição do sal imidazólico na formulação do ionômero de vidro promoveu a ação antibiofilme contra cepas multirresistente sem perda nas características de microdureza e hipoalergenicidade.

Palavras chave: Antifúngicos. Biofilme. Sais Imidazólicos. Materiais Biocompatíveis. Cimentos de Ionômeros de Vidro.

ABSTRACT

Glass ionomer cements are biomaterials composed of acid polymers, basic glass (ionizable) and water, being widely used in dentistry, as restorative materials or as orthodontic bands. These compounds may be susceptible to biofilm formation on their surface by *Candida* species because of the roughness associated with fungal colonization of the oral cavity. Research on antifungal drugs development has focused on the synthesis of new compounds, that present effective action and low toxicity that are able to inhibit the formation of biofilms on biological surfaces. Considering the demand for biomaterials with antibiofilm activity, an ex vivo study was developed with the objective of modifying the structure of a commercially available glass ionomer cement (Ketac® Cem Easymix 3M) by insertion of the imidazole salt 1-n-hexadecyl-3-methylimidazole chloride compared to the cetylpyridinium chloride to make a novel compound with antibiofilm activity. The imidazole salt and cetylpyridinium chloride were added directly to the glass ionomer powder at a ratio of 10 ppm w/w. From this initial addition, the ionomer polymerization reaction was performed, obtaining test specimens (TS) measuring 5 mm Ø × 3 mm h, divided into three groups; *i*) TS₁, composed only of GIC (growth control reference); *ii*) TS₂, glass ionomer and cetylpyridinium chloride added directly to the powder (drug reference); and *iii*) TS₃, glass ionomer and imidazolium salt using the same procedure. Nine strains of non-*albicans Candida*, resistant to usual antifungals, were used; three *C. glabrata* strains (RL22, RL24 and RL25), three *C. tropicalis* strains (57A, 72A and 72P) and three *C. Parapsilosis* strains (RL11, RL20 and RL32), all the strains are deposited in the Mycology Collection at UFRGS. The plastic deformation was evaluated by the microhardness test; the antibiofilm activity by the evaluation of inhibition of growth on the surface of the specimens by scanning electron microscopy and evaluation of hypoallergenicity by the test of the chorioallantoic membrane. The plastic deformation evaluation showed no significant difference among the three groups, with a mean value of 44.2 HV for TS₁, 43.5 HV for TS₂ and 43,1 HV for TS₃. Evaluating the biofilm formation on TSs, all the isolates form biofilm on TS₁ (reference). On the other hand, both TS₂ and TS₃ were able to inhibit surface biofilm growth. The allergenicity evaluation of the three TSs showed no evidence of tissue alteration, considering that the eggs' chorioallantoic membrane remained intact. Considering the presented data, we can conclude that the addition of the imidazole salt in the glass ionomer formulation promoted the antibiofilm action against multiresistant strains without loss in the characteristics of microhardness and hypoallergenicity.

Key words: Antifungals. Biofilm. Imidazolium Salts. Ionic Liquids. Biocompatible Materials. Glass Ionomer Cements.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características e diferenças do biofilme de espécies de <i>Candida não-albicans</i>	15
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema da formação do biofilme.....	14
Figura 2.	Microscopia eletrônica do biofilme fúngico.....	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC - Proteínas transportadoras de cassete de ligação

Al₂O₃ - Alumina

ATP - Adenosina trifosfato

Bcr1 - Fator de transcrição do tipo “zinc-finger C₂H₂”

C₁₆MIImCl - Cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazol

CaF₂ - Fluoreto de cálcio

CIV - Cimento de ionômero de vidro

CHX – Clorexedina

CPC – Cloreto de cetilpiridínio

Cyp51 - Enzima lanosterol 14 α -desmetilase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECM - Matriz extracelular

Erg11 - Enzima lanosterol 14 α -desmetilase

HET-CAM - Ensaio de membrana cório-alantoide

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

K⁺ - Íon potássio

MFS - Superfamília Facilitadora Principal

MgO - Óxido de magnésio

NBDs - Domínios de ligação a nucleotídios

pH - Potencial hidrogeniônico

QSM - Moléculas quorum-sensi

SiO₂ - Sílica

TMDs - Domínios transmembranas

ZnO - Óxido de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO	10
1.2	BIOFILME	12
1.3	CANDIDA NACAVIDADE ORAL	15
1.4	RELAÇÃO BIOFILMES / ORTODONTIA	18
1.5	CANDÍASE ORAL E PERFIS DE RESISTÊNCIA.....	19
1.6	COMPOSTOS IMIDAZÓLICOS	24
1.7	BIOMATERIAIS	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
4	DISCUSSÃO	48
5	CONCLUSÃO.....	52
6	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO

Os cimentos de ionômeros de vidro (CIV) tornaram-se disponíveis com estudos pioneiros de Alan Wilson e Brian Kent na Inglaterra no final da década de 60 e começaram a ser utilizados na década de 70 (NICHOLSON, 1998). Estes compostos passaram por diversas evoluções tecnológicas na sua composição e ganharam, desde então, popularidade tendo seu uso difundido nas mais variadas situações clínicas (PARADELLA, 2004). Por apresentarem uma boa biocompatibilidade, os CIV começaram a ser utilizados fora do campo da odontologia, em situações envolvendo reconstruções de estruturas ósseas e cirurgias otorrinolaringoscópicas (AYDOGAN et al., 2014).

Existem três ingredientes essenciais na composição do CIV: polímeros ácidos solúveis em água, vidro básico (ionizável) e água. Quanto à sua natureza, podem ser classificados em três categorias: os convencionais, os reforçados por metais e os modificados por resina (SMITH, 1998). O cimento de ionômero de vidro convencional apresenta-se sob a forma de pó e líquido no qual o pó é composto de sílica (SiO), alumina (Al_2O_3) e fluoreto de cálcio (CaF_2), entre outros compostos, apresentando pH básico e a parte líquida possui característica ácida por apresentar na sua constituição ácido policarboxílico sob a forma de copolímero com o ácido itacônico, tricarbálico, maleico ou tartárico (SIDHU; NICHOLSON, 2016).

Durante o preparo, na mistura dos componentes conforme as orientações de cada fabricante, ocorre uma reação ácido-base de presa em três etapas (deslocamento iônico, formação de matriz de poliácidos e por fim formação do gel de sílica e incorporação à matriz) para formar um sal hidratado. Este atua como componente de ligação entre as partículas de vidro e a matriz do dente (SIDHU; NICHOLSON, 2016; WANDERLEY et al., 2011).

As principais vantagens do uso de CIV na prática clínica odontológica são sua utilização como material restaurador e fixador, potencial de retenção e liberação de flúor. Apresenta coeficiente de expansão térmico-linear semelhante

à estrutura dentária e ação antimicrobiana associado à atividade anticariogênica (SILVA et al., 2010).

A dureza do CIV é um fator que deve receber atenção quando do seu uso na prática clínica, pois materiais restauradores devem apresentar uma dureza superficial mínima, evitando desta forma desgastes que comprometam a integridade da estrutura (PIRES, 2007).

Em indivíduos com risco de cárie, a utilização de materiais restauradores que contenham flúor é importante para o controle da patologia, pois a liberação de flúor pelo CIV auxilia no controle da cárie evitando a desmineralização e/ou ativando a remineralização do esmalte, com maior intensidade nas primeiras 24 horas – o chamado “efeito explosão” (*burst effect*), o que se dá por dissolução do material e por troca iônica na presença de F⁻ em sua composição (PARADELLA, 2004). Após esse efeito inicial, o CIV torna-se uma forma de armazenamento e liberação lenta e contínua, não apenas de flúor, mas também de cálcio e fosfato, devido à interação principalmente com água tratada e produtos de uso odontológico, substâncias transitórias da cavidade bucal (XU; BURGESS, 2003).

Desde a sua introdução como biomaterial, os CIV tornaram-se material de escolha para cimentação de bandas ortodônticas, e eventualmente *brackets*, pelas características físicas capazes dessa função e também pela sua biocompatibilidade com o esmalte dentário, liberação de flúor, inibição da produção de biofilme e acúmulo de placa (CHARLES, 1998; FARRET et al., 2012; HOCK, 1988).

Outra característica de interesse clínico que favorece o uso dos CIVs, está relacionada ao fato de o coeficiente de expansão térmica destes compostos ser muito próximo ao das estruturas dentárias, evitando formação de espaços favoráveis ao acúmulo de material orgânico (CALVO et al., 2014). Em função das alterações térmicas na cavidade bucal, esmalte e dentina, assim como materiais restauradores, sofrem alterações dimensionais por efeito das variações de temperatura que podem gerar espaços na interface dente/restauração o que permite penetração de fluidos orais e eventuais recidivas de cáries (FOOK et al., 2008).

As características físicas dos CIV, por apresentarem resistências às forças mastigatórias e ao desgaste, além de resistirem ao tracionamento

ortodôntico, favorecem sua aplicabilidade (CORRÊA; OGASAWARA, 2006). Para tanto, alguns estudos têm avaliado parâmetros como resistência à compressão e à microdureza (FARRET et al., 2012). Suas características físicas apresentam variações em função da marca comercial e também das modificações estruturais realizadas de forma experimental, como a inclusão de diferentes compostos com atividade biológica como a clorexedina (CHX), a cetrimida e outros derivados da celulose na forma de nanocristais, ou ainda pela substituição de um percentual de peso do CIV por compostos como óxido de magnésio (MgO) ou óxido de zinco (ZnO) (CORRÊA; OGASAWARA, 2006; DEEPALAKSHMI et al., 2010; KIM et al., 2015; LUÍSA et al., 2013; MARTI et al., 2014; SILVA et al., 2016).

O cloreto de cetilpiridínio (CPC) é um composto de quaternário de amônio eficaz na prevenção da formação de placa bacteriana tendo ação antibiótica contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e cepas de *Candida*, bem como sua inserção em biomateriais como os CIV (SIMMONS et al., 2016). Cabe considerar também que são poucos os relatos na literatura de casos identificados de cepas de *Candida* resistentes ao CPC (EDLIND; SMITH; EDLIND, 2005). Um estudo publicado por Reginato e col. (2017) demonstrou haver resistência ao CPC de cepas de *C. dubliniensis* com resistência induzida in vitro ao fluconazol.

1.2 BIOFILME

Uma grande variedade de bactérias e fungos são capazes de alternar crescimento planctônico e crescimento em comunidades, comumente referido como biofilmes, considerando que até 80% de todos os micro-organismos existentes podem formar biofilme (HARRIOTT; NOVERR, 2011). Os biofilmes são populações de células associadas à superfície em uma matriz extracelular (ECM) com estrutura complexa e heterogeneidade metabólica que possuem fenótipos distintos em comparação com células planctônicas (FANNING; MITCHELL, 2012; RAMAGE et al., 2012; REYNOLDS; FINK, 2001).

Atualmente são destacados fatores essenciais que contribuem para a formação dos biofilmes, como as superfícies de contato, moléculas quorum-sensing (QSM) e nutrientes presentes no meio (FANNING; MITCHELL, 2012). A

regulação gênica da formação de biofilmes envolvendo fatores de transcrição desempenha papel fundamental na regulação positiva e negativa da formação de biofilmes através da formação de hifas e proteínas de superfície celular responsáveis pela aderência (FINKEL; MITCHELL, 2011). Acredita-se que um fator de transcrição do tipo “zinc-finger C₂H₂” (Bcr1) é responsável pela formação de biofilmes do gênero *Candida*, pois além de ser encontrado em *C. albicans*, é encontrado em cepas de *Candida* não-*albicans*, e em outros fatores como sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) extracromossômicos, responsáveis pela formação e manutenção do biofilme (FANNING; MITCHELL, 2012).

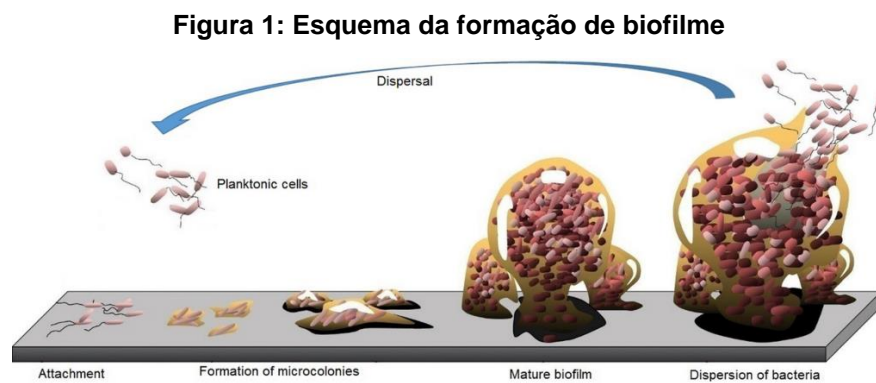
O desenvolvimento de biofilmes ocorre em variadas superfícies, como as inanimadas - estruturas poliméricas em cateteres e bases resinosas de próteses dentárias, e nas biológicas como as mucosas (LEONHARD et al., 2013). A parede celular da levedura é o ponto crucial para a interação inicial entre o fungo e as diferentes superfícies hospedeiras. Acredita-se que esta capacidade de ligação está diretamente relacionada à formação de um tipo de estrutura chamada adesina, que tem sua formação mediada por expressão gênica (BORGHI, 2015; RAMAGE et al., 2012).

As estruturas de biofilme podem diferir dependendo das condições de crescimento. Os biofilmes de *C. albicans*, presentes principalmente após 24-48 horas de crescimento, consistem numa camada de levedura fina responsável pela ligação da camada mais espessa, compreendendo células de blastoconídios e hifas. Estruturalmente podem ser distinguidas várias microcolônias, separadas por canais de água, permitindo a circulação de nutrientes (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013).

Um mecanismo importante de comunicação entre os micro-organismos no biofilme ocorre pela liberação contínua e monitoramento de moléculas chamadas autoindutores ou QSM (NICKERSON; ATKIN; HORNBY, 2006). A concentração destas moléculas aumenta proporcionalmente à população e, após atingir um limiar crítico, é desencadeada uma resposta reguladora de expressão ou inibição coordenada por genes-alvo em toda a população (ALBUQUERQUE; PATRÍCIA; CASADEVALL, 2015).

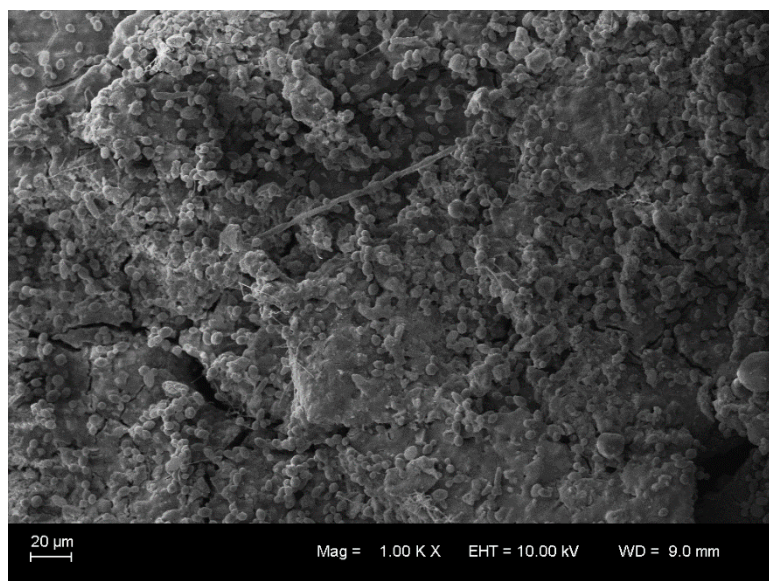
Podemos sintetizar a formação da estrutura do biofilme na ordem cronológica sequencial a partir da aderência da célula leveduriforme a um

substrato, proliferação leveduras com formação de hifas e pseudohifas, acúmulo de MEC à medida que o biofilme se desenvolve e, finalmente, liberação das células leveduriformes não aderidas para o meio. Cabe ressaltar que estas fases, em alguns casos, ocorrem de forma simultânea e não em ordem sequencial (CHUNG; TOH, 2014; FINKEL; MITCHELL, 2011).



Fonte: Adaptado de CHUNG; TOH, 2014

Figura 2: Microscopia eletrônica do biofilme fúngico



Fonte: Dos autores

Algumas espécies de *Candida* alteraram sua morfologia leveduriforme para formas de crescimento filamentoso, aumentando a capacidade de invadir os tecidos do hospedeiro. *C. albicans* pode ser considerada um verdadeiro organismo polimórfico, capaz de crescer como hifas e/ou pseudohifas e como blastoconídios (SANTANA et al., 2012). Cepas de *C. tropicalis* produzem

blastoconídios ovais e pseudohifas. No caso de *C. parapsilosis*, o crescimento do blastoconídio é prevalente, não produzindo hifas verdadeiras, mas apenas pseudohifas e *C. glabrata* não é polimórfica, crescendo apenas como blastoconídios (SILVA et al., 2011).

Tabela 1: Características e diferenças do biofilme de espécies de *Candida* não-*albicans*

Espécie	Formação de Biofilme *	Composição da ECM	Estrutura do Biofilme
<i>C. tropicalis</i>	+	Pouca quantidade de carboidratos e proteínas	Monocamada compacta não-contínua
<i>C. parapsilosis</i>	+	Grande quantidade de carboidratos e proteínas	Monocamada não-contínua ou multicamada
<i>C. glabrata</i>	+/-	Grande quantidade de carboidratos e proteínas	Monocamada compacta ou multicamada

***+ Crescimento evidente de biofilme / - Crescimento pouco evidente do biofilme**

Fonte: Adaptado de SILVA et al.(2012)

Nos últimos anos tem havido um enorme interesse no papel de biofilmes fúngicos sobre doenças infecciosas, estimando-se que 80% das infecções humanas resultam da presença de biofilmes patogênicos, ligados a superfícies bióticas e tecidos animais (FANNING; MITCHELL, 2012; HARRIOTT; NOVERR, 2011).

1.3 CANDIDA NA CAVIDADE ORAL

Existe uma variação na colonização da mucosa oral de indivíduos por *Candida*, e isto pode ter relação direta com a saliva e seus constituintes que desempenham função crucial na manutenção do equilíbrio da flora bucal por meio do desbridamento e lavagem, agregação e supressão da aderência de organismos, desta forma exercendo atividade antibacteriana e antifúngica (DAR-ODEH et al., 2011). A maioria das espécies de *Candida* são susceptíveis a alguns componentes da saliva como a lisozima salivar e a lactoferrina - uma glicoproteína de ligação ao ferro secretada na saliva e que possui ação inibitória na forma de apo-lactoferrina (YEH et al., 1997). Além disso, sabe-se que a IgA

salivar específica inibe a aderência de leveduras a células epiteliais orais, bloqueando as adeseinas (HIBINO et al., 2009a).

Entre as espécies de *Candida*, a mais prevalente na cavidade oral é *C. albicans*, capaz de causar uma variedade de infecções que vão desde a estomatite da dentadura comum e “sapinhos” até infecções sistêmicas mais graves (CZERNINSKI; PIKOVSKY; GATI, 2015). Outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, têm sido isoladas da saliva de indivíduos com ou sem candidíase oral. A candidíase oral é associada a uma variedade de fatores como deficiência de fatores dietéticos, ferro, zinco, vitamina K e vitaminas solúveis em água (RATSON et al., 2009). Outros fatores predisponentes à candidíase oral incluem infância e velhice, hipossalivação, higiene bucal deficiente, aparelhos ortodônticos, respiração bucal, distúrbios endócrinos, antibióticos e esteroides, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e terapêutica com drogas imunossupressoras (CARVALHINHO et al., 2012). Um estudo avaliando a presença de *Candida* em crianças saudáveis, demonstrou um percentual de positividade de 79,2% para a *Candida*, sendo *C. albicans* a de maior positividade (50%) (RATSON et al., 2009).

Estudo realizado na Polônia com 79 estudantes de odontologia poloneses e estrangeiros sem doenças sistêmicas avaliou, dentre outros fatores, ocorrência de candidíase na mucosa oral, com um percentual de positividade de 38% dos sujeitos, com prevalência semelhante nos dois grupos, demonstrando também haver maior frequência de cáries em portadores de *Candida* spp (KRAWIECKA et al., 2013). Outro provável fator é que a presença de leveduras nos túbulos dentinais apresente relação indireta com a cárie, já que a *Candida* reduz a microdureza do esmalte por aumentar a acidez da superfície dentária, facilitando a desmineralização do esmalte e o desenvolvimento da lesão cariogênica (CHARONE et al., 2013).

A ocorrência de cáries radiculares em adultos e idosos tem como fatores predisponentes a exposição da superfície radicular, a remoção ineficaz do biofilme e da placa bacteriana associada a uma dieta cariogênica (STATE; RIHS, 2005). Esta condição pode ser potencializada pela presença de *Candida*, pois como já citado, sugere-se que espécies deste gênero têm potencial cariogênico por facilitar a desmineralização do esmalte e a dissolução dos cristais de hidroxiapatita do esmalte dentário (RATSON et al., 2009; ROSÁRIO et al., 2013).

A candidíase oral é caracterizada por quatro tipos diferentes de manifestações clínicas: eritematosa, pseudomembranosa, quelite angular e candidíase hiperplásica (CAVASSANI et al., 2002). A forma eritematosa é representada por áreas avermelhadas no palato, língua e mucosa; a forma pseudomembranosa caracteriza-se por placas brancas aderentes à mucosa; a quelite angular atinge as comissuras labiais, podendo apresentar pequenas fissuras até quadros ulcerosos com variados aspectos clínicos, associados ao tipo eritematoso ou pseudomembranoso (MARTÍNEZ, 2010). A forma hiperplásica se manifesta sob a forma de placas ou nódulos esbranquiçados, firmemente aderidas às áreas eritematosas, porém com pouca importância clínica (BARBOSA; FARIA, 2014).

A candidíase oral também está associada ao uso de próteses dentárias totais e parciais, relacionada a fatores como os poros da estrutura da resina, que favorecem a aderência e colonização de micro-organismos (CZERNINSKI; PIKOVSKY; GATI, 2015). Sintomas clínicos como dor, halitose, prurido e sensação de queimação podem ocorrer 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 oral (BERGAMO et al., 2016). Estudo realizado por Gauch e col. (2014) na região norte do Brasil, no qual foram avaliados 99 indivíduos que faziam uso de prótese parcial ou total, demonstrou que 58,6% dos participantes apresentaram positividade para leveduras no meio bucal

A candidíase invasiva é considerada problema sério em pacientes neonatos, sendo que a contaminação pode ser vertical, quando a mãe transmite ao filho, ou horizontal, quando ocorre pelo ambiente (BEN ABDELJELIL et al., 2011). Estudo realizado por Araújo e col.(2013) na região Norte do Brasil, encontrou percentual de colonização por *Candida* superior a 80%, com incidência de 5,4% de candidíase em neonatos

Lesões ulcerativas associadas a infecções por *Candida*, apesar de não serem comuns, podem estar associadas à presença do fungo com fatores do hospedeiro como: colonização fúngica na infância, infecções virais associadas, como no caso de herpes simples, herpes zoster e hepatites, podendo causar lesões ulcerativas na língua (LEÃO; GOMES; PORTER, 2007).

A relação entre neoplasias bucais, principalmente carcinoma epidermoide e a presença de *Candida*, foi proposta por Birman, considerando uma relação entre a presença de compostos nitrosos produzidas por fungos, associados a fatores exposicionais como tabagismo e alcoolismo, também fontes de compostos nitrosos. O estudo, no entanto, apresentou resultados negativos para a relação, apesar de mais de 40% dos indivíduos investigados serem portadores de cepas fúngicas (BIRMAN, 2000). Pacientes submetidos a quimio e radioterapia podem apresentar risco aumentado de desenvolver infecções fúngicas, e em consequência de alterações da mucosa oral, terem o patógeno disseminado na corrente sanguínea, evoluindo para casos de fungemia (SPOLIDORIO, 2003). Desta forma, torna-se muito importante a detecção e prevenção do avanço da infecção através de determinação da espécie e sua avaliação frente ao perfil de suscetibilidade e resistência aos antifúngicos (KURNATOWSKI; MOQBIL; KACZMARCZYK, 2014).

1.4 RELAÇÃO BIOFILMES / ORTODONTIA

O equilíbrio da flora bucal é fator crucial para a manutenção da homeostase e saúde da cavidade oral (GÜNDÜZ ARSLAN et al., 2008). Alterações que modificam o meio podem ser fatores desencadeante de doenças periodontais e lesões cariogênicas (HÄGG et al., 2004). A modificação da microbiota oral apresenta forte associação com a aplicação de aparelhos ortodônticos, que podem dificultar a higiene bucal e aumentar o número de áreas de retenção de placas. Nos últimos anos, o efeito de aparelhos ortodônticos sobre a prevalência de espécies de *Candida* na cavidade oral tem sido investigado, mesmo que ainda de forma muito limitada. Estudos revelam a existência de altos índices de colonização por *C. albicans* em função do uso de aparelhos ortodônticos já nos primeiros meses da colocação do dispositivo, já que estes tendem a elevar a taxa de prevalência de colonização durante o período de tratamento (KHANPAYEH; JAFARI; TABATABAEI, 2014; TOPALOGLU-AK et al., 2011).

Em estudo realizado na Turquia, 72 pacientes foram acompanhados por um ano durante o tratamento ortodôntico. Neste período foram coletadas

amostras de saliva antes e durante o tratamento ortodôntico no 1º, 6º e 12º mês e amostras dos aparelhos durante o 1º, 6º e 12º mês de tratamento. Do total dos indivíduos, 42 se mostraram portadores de *Candida*, sendo que *C. albicans* foi identificada em 31 pacientes, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. kefyr* em três pacientes *C. parapsilosis* em dois pacientes. Durante o tratamento ortodôntico, a contagem de micro-organismos aumentou, tanto na saliva quanto na superfície dos dentes (GÜNDÜZ ARSLAN et al., 2008). Outra pesquisa, realizada em Porto Alegre, evidenciou que de um total de 108 indivíduos avaliados, mais da metade apresentou positividade em relação a colonização por *Candida*, sendo que oito dos participantes apresentaram positividade para mais de uma espécie, incluindo *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Outro fator avaliado nessa pesquisa foi que alguns apresentavam resistência intrínseca aos antifúngicos usuais (MEZZARI et al., 2012).

Pesquisas na área da ortodontia também avaliaram a relação do tipo de *bracket* com a colonização não apenas por *Candida*, mas também por outros micro-organismos com potencial cariogênico presentes na cavidade bucal. Estudo realizado na Argentina avaliou a diferença de formação de biofilme em *brackets* compostos, de cerâmica e de metal, no qual ficou evidenciado menor taxa de formação de biofilmes em *brackets* de metal, provavelmente em função do tipo de superfície, que dificultaria a aderência do biofilme (BRUSCAA; ROSA, 2007).

Além das condições orais usualmente investigadas, condições sistêmicas de pacientes com uso de aparelhos ortodônticos como redução nos níveis de vitamina B12 e ácido fólico podem ter influência sobre a colonização de *Candida*, sugerindo que a aderência do biofilme fúngico nos tecidos biológicos está associada à redução destes parâmetros, já que estes compostos favorecem a integridade e a resistência tecidual (DAR-ODEH et al., 2011).

1.5 CANDÍASE ORAL E PERFIS DE RESISTÊNCIA

Na década de 90, cepas de *C. albicans* representavam 70-80% dos isolados fúngicos de pacientes infectados. Apesar de a maioria dos casos de candidíase atualmente ainda serem causados por *C. albicans*, um número

crescente de infecções causadas por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* vem sendo relatados nas últimas duas décadas, principalmente em pacientes com imunidade comprometida (KATHIRAVAN et al., 2012; SILVA-DIAS et al., 2015; SILVA et al., 2011).

Considerando que existem diferentes definições de resistência antifúngica, torna-se imprescindível diferenciar resistência *in vitro* de resistência clínica a agentes antifúngicos (ROGERS, 2006). A resistência *in vitro* é uma medida laboratorial ajustada à gama de resultados de suscetibilidade para fármacos e espécies fúngicas particulares. No contexto clínico, a resistência é definida como a persistência ou a progressão da infecção fúngica, apesar da intervenção de uma terapia antifúngica apropriada determinada por doses adequadas que foram administradas por uma via apropriada (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015). A resistência aos compostos antifúngicos pode ser devido a fatores intrínsecos de determinadas espécies. Esta resistência pode ter sido adquirida em função de vários fatores já amplamente discutidos pela comunidade científica como as bombas de efluxo, síntese de ergosterol, EMC, QSM, taxa de crescimento celular, entre outros (TAFF et al., 2014) .

Outro ponto a ser destacado em relação a resistência é a capacidade de formação de biofilmes (ROGERS, 2006). A EMC presente na estrutura do biofilme é considerada uma barreira física que impede a difusão de compostos antifúngicos, limitando desta forma a chegada do fármaco às células presentes no interior do biofilme (BAILLIE; DOUGLAS, 2000). A expressão de genes de resistência a fármacos é um fenômeno bem conhecido, conforme demonstrado por Ibrahim e col (2015) que avaliaram a formação de biofilme de cepas de *Candida*, relacionado ao perfil de suscetibilidade aos principais antifúngicos como fluconazol, voriconazol e anfotericina B e sua relação com a expressão de genes de resistência. *C. albicans* e, em menor extensão, *Candida* não-*albicans* são comumente encontrados nas cavidades bucais de adultos e crianças e raramente causam doença, sendo que isolados orais de *C. glabrata* são produtores fortes de biofilme, enquanto *C. albicans* e *C. tropicalis* são produtores moderados, associado ao fato de que estas cepas servem como reservatório para inoculação e infecções em outras partes do corpo (SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2013). Destaca-se que importância dos biofilmes na placa dental e em doença periodontias é uma proposta de caráter recente, considerando que

isolados de *Candida* formadores de biofilme apresentam maior resistência aos fármacos antifúngicos do que cepas não formadoras de biofilme (DHANASEKARAN et al., 2014).

Embora o arsenal tenha se expandido, antifúngicos atualmente disponíveis não satisfazem os crescentes requisitos no tratamento para obtenção de sucesso no caso de infecção nas populações complexas dos doentes. O desenvolvimento de novos antifúngicos tem sido constantemente necessário na terapia clínica (KATHIRAVAN et al., 2012). Fármacos antifúngicos como isavuconazol, ravuconazol e albanconazol são triazóis com espectro expandido que têm demonstrado resultados promissores no tratamento de doenças fúngicas como candidíase, aspergilose, zigomicoses, criptocoses e outras (PASQUALOTTO; THIELE; GOLDANI, 2010). Um estudo realizado por Liu e col. avaliou a combinação de fluconazol associado a moléculas com atividade antibacterianas como tetraciclinas, quinolonas, reguladores de cálcio, inibidores de calcineurina entre outros, destacando a existência de um sinergismo aumentando a permeabilidade de membrana, afetando a homeostase de íons de membrana e inibindo vias enzimáticas, com inibição da formação de biofilme de *C. albicans* (LIU et al., 2014). Pesquisas com sais imidazólicos apresentaram resultados promissores, pois além de atividade antifúngica contra micoses oportunistas, estes compostos não apresentaram toxicidade frente às células de defesa humana (SCHREKKER et al., 2013).

Os principais compostos antifúngicos são divididos conforme o seu mecanismo de ação em diferentes alvos da estrutura da célula fúngica (YAPAR, 2014). Os compostos azólicos são o grupo de fármacos antifúngicos usualmente utilizados na prática clínica (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). São conhecidos como inibidores da síntese de ergosterol pois atuam por inibição de uma enzima chave, a lanosterol 14alfa-metilase, codificada pelo gene ERG11 (BENDAHA et al., 2011). Esta inibição ocorre através da ligação do átomo de nitrogênio livre do anel azol ao átomo de ferro do grupo heme da enzima. A inibição da desmetilação do lanosterol inibe a formação do ergostgerol, principal componente da manutenção da integridade da membrana celular fúngica (PASQUALOTTO; THIELE; GOLDANI, 2010).

Esta classe de fármacos abrange os antifúngicos usualmente utilizados, como cetoconazol, o primeiro composto de uso oral com largo espectro de ação,

itraconazol, utilizado para tratamento de micoses sistêmicas e fluconazol, utilizado em dose única para tratamento de candidíase vaginal. A evolução dos compostos azólicos compreende fármacos como o voriconazol, primeiro composto hidrossolúvel de baixo peso molecular, o posoconazol, que apresenta característica lipofílica e é usado para tratamento de micoses sistêmicas e o ravuconazol que apresenta amplo espectro de ação usado no tratamento de isolados clínicos resistentes ao flucanazol (KATHIRAVAN et al., 2012).

Outro grupo de fármacos antifúngicos são os disruptores do ergosterol conhecidos como polienos, classificadas como moléculas anfifílicas orgânicas cíclicas (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Estes compostos são composto secundários produzidos de culturas do gênero *Streptomyces noursei*, que atuam através de ligação com o ergosterol (principal molécula de membrana) provocando um aumento de permeabilidade da membrana plasmática, graças a sua estrutura anfifílica, formando assim poros, permitindo o efluxo de potássio (K^+), provocando lise celular (KELLER et al., 2015). A anfotericina B e a nistatina são os principais representantes desse grupo (KATHIRAVAN et al., 2012). O primeiro composto apresenta largo espectro de ação e alta seletividade à membrana fúngica e reduzida toxicidade às células humanas por apresentar baixa ligação ao colesterol, podendo além do tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, ser utilizado no tratamento de infecções parasitárias (EL-AZIZI; FARAG; KHARDORI, 2012; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). A nistatina e seus derivados apresentam uma porção amino de estrutura grande, que reduz a toxicidade frente a células humanas, usado principalmente no tratamento de micoses orofaríngeas e de mucosas, por não apresentar absorção pelo trato gastrointestinal (BOROS-MAJEWSKA et al., 2014; MARINA et al., 2010).

O terceiro grupo que merece destaque são os fármacos conhecidos como inibidores da síntese de glicanos, que atuam como inibidores não competitivos da enzima $\beta(1-3)$ glicano sintetase, responsável pela síntese dos glicanos compostos essenciais responsáveis pela manutenção das características físicas e rigidez da parede celular (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Quimicamente são classificados como lipopeptídeos cíclicos semissintéticos obtidos de diversas cepas fúngicas, que apresentam como alvo farmacológico exclusivamente células fúngicas, provocando alteração osmótica e morte

celular dos blastosporos, surgindo como nova opção terapêutica com menor toxicidade, quando comparadas com os polienos (AGUILAR-ZAPATA; PETRAITIENE; PETRAITIS, 2015; CORTÉS; RUSSI, 2011; KATHIRAVAN et al., 2012). Os principais compostos que representam este grupo são a caspofungina, micafungina e anidulafungina, derivados das cepas de *Glarea lozoyensis*, *Coleophoma empetri* e *Aspergillus nidulans* respectivamente (AGUILAR-ZAPATA; PETRAITIENE; PETRAITIS, 2015). Clinicamente estes compostos apresentam vantagem por possuírem amplo espectro de ação contra várias cepas fúngicas clinicamente relevantes como *Candida* e *Aspergillus*, usualmente são administrados por via intravenosa em uma dose diária em função de apresentarem biotransformação lenta e reduzida absorção oral (CORTÉS; RUSSI, 2011). Outra característica muito importante relacionada a estes compostos são as raras interações medicamentosas (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Um mecanismo comum de resistência a fármacos, tanto de antifúngicos quanto outras classes, se dá pela expressão de proteínas transportadoras de cassete ligadas ao ATP (ABC) (TE BRAKE et al., 2016). As proteínas de membrana integrais contêm sítios de ligação de aminoácidos que estão envolvidos na ligação de ATP dentro de regiões da proteína conhecidas como domínios de ligação a nucleotídeos (NBDs). A ligação e hidrólise de ATP impulsiona a translocação de moléculas através da membrana através dos domínios transmembranas (TMDs) da bomba de proteínas (SHARMA; PRASAD, 2011).

As proteínas ABC contribuem para a resistência aos fármacos antifúngicos através do bombeamento de fármacos para fora de células fúngicas, favorecendo desta forma a resistência aos fármacos dos biofilmes orais (CANNON et al., 2009).

Embora a resistência aos antifúngicos poliênicos seja rara, há uma resistência significativa aos compostos azólicos e uma emergente resistência as equinocandinas. Uma tendência preocupante é o aparecimento de isolados de *C. glabrata* resistentes tanto a azóis como a equinocandinas. Existem vários mecanismos que podem causar resistência dos fungos aos compostos azólicos, incluindo a sobre expressão ou mutações na enzima lanosterol 14 α -desmetilase (Erg11 ou Cyp51) e alterações em outros genes envolvidos no metabolismo do

esterol (FORASTIERO et al., 2013). O mecanismo mais frequente que resulta em resistência é a expressão de bombas de efluxo de fármacos. Estas bombas de efluxo pertencem a duas famílias de proteínas principais, a Superfamília Facilitadora Principal (MFS) ou o grupo ABC de transportadores. Tipicamente, a gama de substratos bombeados por transportadores MFS é relativamente pequena se comparada com as proteínas ABC (CANNON; HOLMES, 2015). A maioria dos fungos na cavidade oral estão presentes em biofilmes muitas vezes caracterizados como biofilmes multiespécies que tipicamente demonstram fenótipo de resistência antifúngica. Sua principal característica é a presença de bombas de efluxo na membrana celular (NIIMI; FIRTH; CANNON, 2010).

Vários estudos têm sido direcionados na utilização de produtos naturais e extratos de plantas com potencial antifúngico associados a colutórios bucais, que já estão disponíveis no mercado, assim como associação de moléculas antifúngicas clássicas, como a nistatina, com óleos essenciais, na tentativa de reduzir a viabilidade do biofilme fúngico oral (CASTRO et al., 2015).

Infecções orais fúngicas recorrentes ocorrem não apenas em pacientes imunocomprometidos, mas também em indivíduos que não apresentam nenhum perfil de deficiência imunológica diagnosticado, indicando que cepas de *Candida* apresentam uma resistência adquirida aos antifúngicos usuais, que pode ser ocasionado por erros de tratamento tanto com doses subefetivas, bem como com o uso de antifúngico inapropriado para a infecção (AL-SHAYYAB et al., 2015).

1.6 COMPOSTOS IMIDAZÓLICOS

Na busca de novas moléculas com atividade antifúngica, pesquisas têm focado na síntese de moléculas químicas diferenciadas que possuam ação antifúngica efetiva, com baixa toxicidade e que possam substituir na prática clínica, os fármacos antifúngicos usuais que não apresentam mais eficácia clínica, como fluconazol e anfotericina B (BERGAMO et al., 2015a; COAD et al., 2014; SCHREKKER et al., 2013).

O uso de moléculas com ação eletrostática sobre a parede e a membrana celular são caracterizadas como efetivas na ação antimicrobiológica (COAD, 2014). A utilização de sais imidazólicos com cadeias alquílicas substituídas tem

apresentado atividade antifúngica significativa sem danos às células de defesa. O mecanismo de ação antifúngico proposto está baseado numa ação inibitória envolvendo dois mecanismos de ação diferentes, sendo o primeiro a permeabilidade da membrana celular fúngica devido a propriedade anfifílica conferida pelas cadeias alquílicas. O segundo passo da atividade antifúngica seria a inibição do sistema enzimático citocromo P450, afetando todo o metabolismo celular. Estes compostos aparentemente não provocam dano ao DNA nem na estrutura celular dos leucócitos, nas concentrações necessárias para causar dano às células fúngicas (BERGAMO et al., 2016; SCHREKKER et al., 2016, 2013).

Bérgamo e col., a partir dos dados referidos por Schrekker e col. (2013) testaram a atividade do sal imidazólico cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazol (C₁₆MImCl) contra células planctônicas e biofilmes formados por cepas normais e multirresistentes de *C. tropicalis*. Os autores demonstraram que o composto apresentou boa penetração no biofilme, caracterizando um efeito antifúngico, mesmo em baixas doses (BERGAMO et al., 2015b; DALLA LANA et al., 2015).

1.7 BIOMATERIAIS

As estratégias por trás do desenvolvimento e inovação de biomateriais com atividade antimicrobiana visam à redução da capacidade de adesão, inativação e morte celular dos agentes formadores do biofilme. Substâncias aderidas à estrutura do biomaterial ou montadas em sistemas de liberação/lixiviação para o meio têm demonstrado atividade antibiofilme, com seletividade de ação (CAMPOCCIA; MONTANARO; ARCIOLA, 2013).

Compostos com atividade inibitória sobre a formação de biofilme fúngico ganharam espaço nas pesquisas envolvendo biomateriais na área odontológica, como o uso da CHX impregnada em polímeros tendo sua atividade comparada com a ação do fluconazol, demonstrando redução na aderência de *C. albicans* às superfícies, e reduziu a formação de hifas, sendo uma boa alternativa para o tratamento da candidíase oral (SALIM et al., 2013). Os CIV têm sido alvo de estudo com a inclusão de nanopartículas de CHX no composto nos quais, além

da liberação do princípio ativo proposto, as características físicas e funcionais do material, como resistência à tração, liberação de flúor e estrutura do composto foram testadas (HOOK et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Modificar a estrutura de um CIV comercialmente disponível, inserindo uma molécula de sal imidazólico para compor um novo biomaterial funcionalizado com atividade antibiofilme fúngico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inserir o sal imidazólico cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazol (C₁₆MImCl) na estrutura do CIV;
- Avaliar alteração da composição básica do CIV através do teste físico de deformação plástica (microdureza);
- Avaliar ação antibiofilme do novo biomaterial comparado com cloreto de cetilpiridínio através do método de corpo de prova;
- Avaliar por microscopia eletrônica a eficácia da ação antibiofilme do biomaterial;
- Avaliar se o biomaterial induz irritação/lesão tecidual através do teste ensaio de membrana cório/alantoide (HET-CAM).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico que será submetido à revista ***DENTAL MATERIALS***. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão representam a íntegra deste estudo.

Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO encontrados no final da dissertação apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados apresentados no manuscrito. As REFERÊNCIAS apresentadas são relacionadas somente aos itens INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO desta dissertação.

Cimento de ionômêro de vidro funcionalizado com sal imidazólico: biomaterial com propriedades antibiofilme fúngico

Alexandre Ehrhardt ^{1, 2, 5}, Jéssica Zolim Andreatto Mandelli ², Vanessa Bérغامo ³, William Lopes ⁴, Tiago Aurélio Donassollo ⁵, Ricardo Keitel Donato, ⁶ Alexandre Meneghello Fuentefria ^{1,3}

¹ Programa de Pós graduação em Farmacologia e Terapêutica , Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil;

² Laboratório de Biomedicina, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Carazinho, RS, Brasil;

³ Laboratório de Micologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil;

⁴ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil;

⁵ Faculdade de Odontologia, Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul (FASURGS), Passo Fundo, RS, Brasil.

⁶ MackGraphe (Centro de Pesquisa em Grafeno e Nano-materiais), Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Modificar a estrutura de um Cimento de Ionômero de Vidro comercialmente disponível através da inserção do sal imidazólico C₁₆MImCl para compor um novo biomaterial com atividade antibiofilme fúngico. *Metodologia:* Foram confeccionados corpos de prova utilizando o Ionômero comercial Ketac[®] Cem Easymix 3M, no qual foram acrescentados o cloreto de cetilpiridínio e o C₁₆MImCl na proporção de 10 ppm p/p. Avaliou-se a atividade antibiofilme dos corpos de prova (CP) modificados frente a 9 cepas de *Candida não-albicans* formadoras de biofilme e multirresistentes, através dos testes de contagem de colônias e microscopia eletrônica de varredura. Foi também realizada a verificação da hipoalergenicidade pelo teste da membrana cório-alantóide e avaliação da deformação plástica pelo teste da microdureza. *Resultados:* Os CP modificados com cloreto de cetilpiridínio e o sal imidazólico apresentaram atividade antibiofilme. O teste de microdureza não apresentou diferença significativa entre o ionômero na composição original e as modificações

propostas, bem como a ausência do efeito irritante foi observado no modelo *ex vivo*. **Conclusão:** A inserção do sal imidazólico na estrutura do ionômero inibiu a adesão das cepas de *Candida* e não se mostrou alergênico, sugerindo a possibilidade do uso aplicado a odontologia.

Descritores: antifúngicos; imidazóis; materiais biocompatíveis; cimentos de ionômero de vidro

Abstract

Objective: Modify the structure of a commercially available Glass Ionomer Cement by inserting the imidazolium salt Hexadecyl-3-methylimidazolium chloride (C₁₆MImCl), composing a new biomaterial with anti-fungal biofilm activity. **Materials and Method:** Test specimens were prepared using the commercial ionomer Ketac® Cem Easymix 3M, in which cetylpyridinium chloride or C₁₆MImCl were added at the ratio of 10 ppm w/w. The modified specimens' antibiofilm activities were evaluated against 9 strains of multidrug resistant non-*albicans Candida* species, evaluating their colony counting and scanning electron microscopy imagery. The hypoallergenicity evaluation, by the chorioallantoic membrane and microhardness plastic deformation tests were also performed. **Results:** The cetylpyridinium chloride and imidazolium salt modified specimens presented antibiofilm activity. The microhardness test showed no significant difference between the original ionomer composition and modified ones. Moreover, no irritant effect could be observed in the *ex vivo* model. **Conclusion:** The imidazolium salt insertion in the ionomer structure inhibited the *Candida* strains adhesion and was not allergenic, suggesting it as a possible of the use applied to dentistry.

Keywords: antifungals; antibiofilm; Imidazolium salts; Ionic liquids; Biocompatible materials; Glass ionomer cements

INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de bactérias e fungos são capazes de alternar crescimento planctônico e crescimento em comunidades, comumente referido

como biofilmes (Harriott and Noverr, 2011), considerando ainda que a presença de biofilmes patogênicos ligados às superfícies bióticas e tecidos animais são responsáveis por cerca de 80% das infecções humanas. (Fanning and Mitchell, 2012). Os biofilmes são populações de células associadas à superfície em uma matriz extracelular (ECM) que possuem fenótipos distintos em comparação com células planctônicas (Ramage *et al*, 2012).

Atualmente são destacados fatores essenciais que contribuem para a formação dos biofilmes, como as superfícies de contato, moléculas quorum-sensing (QSM) e nutrientes presentes no meio (Leonhard *et al*, 2013; Albuquerque, Patrícia; Casadevall, 2015). A formação da estrutura do biofilme usualmente segue uma ordem cronológica sequencial a partir da aderência da célula leveduriforme a um substrato, proliferação leveduras com formação de hifas e pseudohifas, acúmulo de ECM à medida que o biofilme se desenvolve e, finalmente, liberação das células leveduriformes não aderidas para o meio, (Chung and Toh, 2014).

Diversos estudos revelam a existência de altos índices de colonização por *C. albicans* em virtude do uso de aparelhos ortodônticos (Hibino *et al*, 2009; Cross *et al*, 2010; Khanpayeh *et al*, 2014). Espécies de *C.tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, que tem sido isoladas da saliva de indivíduos com ou sem manifestação clínica de candidíase (Ratson *et al*, 2009; Dar-Odeh *et al*, 2011). Khanpayeh *et al* (2014) verificaram esta condição avaliando pacientes sob o uso de aparelhos ortodônticos fixos e móveis. A importância do biofilme durante o tratamento ortodôntico, associada a formação da placa dental e as doenças periodontais é um proposta de caráter recente (Dhanasekaran *et al*, 2014; Klaus *et al*, 2016), considerando que isolados de *Candida* formadores de biofilme apresentam uma maior resistência ao antifúngicos usuais (Czerninski *et al*, 2015).

Pesquisas para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos tem focado na síntese de novos compostos como ravuconazol e albaconazol (Pasqualotto *et al*, 2010). Liu *et al* (2014) também demonstraram resultados promissores na associação de antifúngicos usuais com compostos antimicrobianos como tetraciclina e quinolonas no tratamento de infecções por *Candida*. Além do desenvolvimento de compostos químicos, modificações na estrutura de polímeros visam reduzir a atividade antifúngica (Jäger *et al*, 2015). Estes

esforços focam na busca por novas estratégias e compostos que possuam ação efetiva, baixa toxicidade e que possam substituir na prática clínicas os antifúngicos usuais como eficácia reduzida e toxicidade, como fluconazol e anfotericina B, respectivamente (Bergamo *et al*, 2015).

Diversas estratégias buscam o desenvolvimento e a inovação de biomaterias visando a redução da capacidade de adesão, inativação e morte celular de agentes formadores de biofilme (Campoccia *et al*, 2013). Os cimentos de ionômero de vidro (CIV) são uma classe de biomateriais com uso muito difundido na odontologia atual, em virtude da sua biocompatibilidade com o esmalte dentário apresentando múltiplas aplicações (Hook *et al*, 2014) como material restaurador e fixador de bandas ortodônticas (Silva *et al*, 2010). Esses compostos devem possuir e manter características físico-químicas como manutenção de sua estrutura física, referida como microdureza (Bertolini *et al*, 2010), devem permitir uma troca de flúor com o meio bucal (Paradella, 2004), auxiliando na inibição da formação da placa dental e formação de biofilme (Farret *et al*, 2012).

A estrutura química do CIV permite a realização de modificações estruturais, como a inclusão de diferentes compostos com atividade biológica como o cloreto de cetilpiridínio (CPC) (Simmons *et al*, 2016), clorexedine (CHX) e cetrimida (Deepalakshmi *et al*, 2010), derivados da celulose na forma de nanocristais (Silva *et al*, 2016), ou ainda pela substituição de um percentual de peso do CIV por compostos como óxido de magnésio (MgO) ou óxido de zinco (ZnO) (Kim *et al*, 2015).

Bergamo *et al*, (2015), a partir dos dados referidos por Schrekker *et al*. (2013), testaram a atividade do sal imidazólico cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazol (C₁₆MI_mCl) contra células planctônicas e biofilmes formados por isolados sem perfil de resistência e multirresistentes de *Candida não-albicans*. Os autores demonstraram que o composto apresentou boa penetração no biofilme, caracterizando um efeito antifúngico, mesmo em baixas concentrações (Bergamo, Balbuena, *et al*, 2015; Bergamo, Donato, *et al*, 2015; Dalla Lana *et al*, 2015). Schrekker *et al* (2016), através da inserção de sais imidazólicos em ácido polilático, demonstraram haver uma condição bastante promissora da inserção deste composto em biomateriais de uso na área médica.

Considerando a real necessidade do desenvolvimento de biomaterias com atividade antibiofilme, o objetivo deste estudo *ex vivo*, foi modificar a estrutura de um CIV comercialmente disponível através da inserção da molécula de C₁₆MImCl para compor um novo biomaterial com atividade antibiofilme comparando com o CPC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção do Cimento de ionômero de vidro e confecção dos corpos de prova

Para o presente estudo foi selecionado o cimento de ionômero de vidro (CIV) Ketac® Cem Easymix 3M sendo preparados corpos de prova (CP) de 5 mm Ø X 3 mm h. Os corpos de prova foram divididos em três grupos. Grupo 1 (CP₁), CP compostos apenas de CIV- controle de crescimento; grupo dois (CP₂), CIV acrescido com cloreto de cetilpiridínio [CPC (Labsynth®, Brasil)] na proporção de 10 ppm p/p acrescentado diretamente ao pó; e grupo 3 (CP₃), CIV acrescido de C₁₆MImCl na proporção de 10 ppm p/p com o mesmo procedimento realizado para o grupo 2. Após a adição direta do CPC e do C₁₆MImCl ao pó do CIV, os compostos foram colocados em tubos de ensaio de vidro neutro de tampa com rosca, homogeneizados por inversão em homogeneizador hematológico (ALB 260 H, Médica) por 2 horas. As reações de polimerização dos CPs foram realizadas conforme orientação do fabricante contidas na bula do CIV, misturando o pó com o polímero de ácido acrílico, misturando com espátula e aguardando o tempo de polimerização. Os corpos de prova foram mantidos em solução de saliva artificial conforme metodologia descrita por Hook et al (2014) com modificações por um período de 28 dias

Avaliação da deformação plástica (microdureza)

Os corpos de prova CP₁, CP₂ e CP₃ após a reação de polimerização foram inseridos em uma base epóxi plana (Poxipol, Uruguai) e analisados no microdurômetro Shimadzu HMV-G 20ST do tipo VICKERS (HV) com carga de indentação de 200g por 15 segundos.

Seleção de cepas fúngicas

Nove cepas de *Candida não-albicans* resistentes aos antifúngicos usuais foram utilizados no estudo, sendo 3 cepas de *C. glabrata* (RL22, RL24 e RL25),

3 cepas de *C. tropicalis* (57A, 72A e 72P) e 3 cepas de *C. parapsilosis* (RL11, RL20 e RL32). Todas as cepas estão depositados na Coleção de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Teste de formação de biofilme nos Corpos de Provas (CP₁ / CP₂ / CP₃)

A formação do biofilme foi avaliada utilizando a metodologia descrita por Bergamo et al. (2016), com modificações. As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud (HiMedia Laboratories, India) durante 24 h a 37 °C, das quais cinco colônias jovens foram adicionadas a 2 mL de caldo soja tripticaseína [TSB HiMedia Laboratories, India] e incubadas durante 24 h a 35° C para obtenção do inóculo fúngico. Os CP foram colocados juntamente com 200 µL do inóculo e 1,8 mL de caldo infuso de cérebro e coração [BHI HiMedia Laboratories, India] em poços de placa de cultura celular (Nest). Após incubação (72h/ 35°C), os CP foram lavados três vezes com salina estéril 0,9%, colocados em tubos de ensaio com 2 mL de água peptonada e submetidos ao ultrassom na frequência de 40 KhZ por 10' (Quimis, Brazil). Após este procedimento foram realizadas diluições seriadas correspondentes a 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³, e a seguir, 20 µL de cada diluição incubados por 48h/35°C em placas de ágar Sabouraud para contagem das células fúngicas.

Avaliação da atividade antibiofilme por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Após o ensaio de formação do biofilme com os 9 isolados do estudo [*C. glabrata* (RL22, RL24 e RL25), *C. tropicalis* (57A, 72A e 72P) e *C. parapsilosis* (RL11, RL20 e RL32)], as células planctônicas foram removidas dos CP por lavagem em triplicata com cacodilato (Sigma-Aldrich) 0,1 M e então adicionado 500 µL de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) a 2,5% em cacodilato de sódio 0,1 M (dimetilarsenato) por 10 min para fixação da estrutura do biofilme. Foram realizadas três lavagens com cacodilato de sódio 0,1 M e sacarose (Sigma-Aldrich) 1M com objetivo de remover o fixador e após as amostras foram desidratadas em série com etanol (Merck) [30 (1x), 50 (1x), 70 (1x) e 95 (1x)], durante 5 min e [100% vol (2x)] durante 10 min. cada, e realizou-se o ponto crítico (BAL-TEC Critical Point Dryer) utilizando CO₂ líquido e etanol (oito ciclos). As amostras foram aderidas em stubs metálicos cobertos com uma fita condutora

de carbono PELCO e posteriormente revestidas com uma camada de ouro de 15-20 nm. As imagens foram capturadas em várias ampliações e regiões diferentes usando microscopia eletrônica de varredura (Carl Zeiss EVO® MA10), adaptado de Araújo et al. (2016).

Avaliação de Hipoalergenicidade – teste HET-CAM

Os três tipos de CP propostos para o estudo foram testados na forma de pó. Como controle negativo foi utilizada solução salina 0,9% e controle positivo solução 0,1M de NaOH (padronizada com $C_8H_5KO_4$). Ovos férteis frescos brancos coob foram incubados por 10 dias a temperatura entre $37,0 \pm 0,5$ °C e humidade relativa de 70%. No 10º dia, com auxílio de motor de bancada (Beltec, Brazil) e broca diamantada PM número 10 (KG), a casca do ovo em torno do espaço aéreo foi cuidadosamente removida expondo a membrana cório-alantóide. Para o teste foram adicionados sobre a membrana 300 µL/mg dos controles e dos pós do CIV (grupos 1, 2 e 3). Os diferentes compostos foram deixados em contato com a membrana por 05 minutos e após feita a remoção com solução salina isotônica avaliando o grau de alteração tecidual através de hemólise, de lise celular e de coagulação. Os efeitos irritantes das amostras foram observados após 30 s, 2 min e 5 min da aplicação e os resultados da escala de irritação (IS) foram avaliados conforme a equação (1), onde: de 0 a 4,9 s é considerado como não irritante (ou praticamente sem irritação) e de 5-0 a 21s é considerado como irritante (moderado / grave ou extremo). Onde o tempo de hemorragia, tempo de lise e tempo de coagulação (em segundos) são considerados na primeira aparição de hemorragia, lise de vasos e coagulação de proteínas, respectivamente. O IS, quando baseado nesta fórmula, apresenta um valor máximo de 21. (ICCVAM, 2010).

Equação 1 – formula de cálculo da escala de irritação

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

ANALISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a deformação plástica dos materiais e os resultados avaliados pelo teste Kruskal-Wallis, utilizando o programa BioStat 5.0.

RESULTADOS

Avaliação da deformação plástica (microdureza)

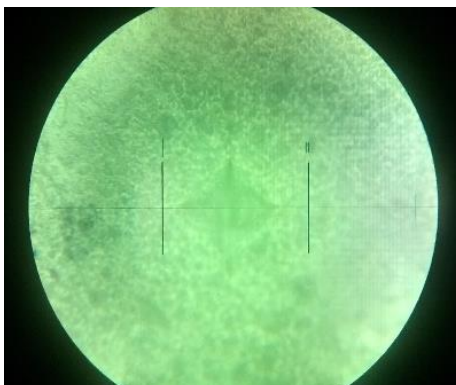
A análise dos resultados da avaliação da deformação plástica indicou não haver diferença entre os três grupos de CPs avaliados (Tabela 1) apresentando um valor médio de 44,2 HV para o CP₁, 43,5 HV para CP₂ e 43,1HV para o CP₃. A área de indentação obtida pelo teste referente aos valores apresentados está demonstrada na figura 1, representada por uma marcação central no CP na forma de losango.

Tabela 1: Valores de microdureza obtidos no teste de indentação dos corpos de prova testados

	CP ₁ (CIV)	CP ₂ (CIV + CPC)	CP ₃ (CIV + C ₁₆ MImCl)
1 ^a medição	45,9 HV	42,0 HV	46,3 HV
2 ^a medição	42,4 HV	46,1 HV	40,1 HV
3 ^a medição	44,4 HV	42,6 HV	42,9 HV
Média	44.2 HV	43.56 HV	43.1 HV

CP – Corpo de prova CIV- cimento de ionômero de vidro; CPC – cloreto de cetilpiridínio; C₁₆MImCl – cloreto de 1-n-hexadecyl-3-methylimidazol; HV – Vickers.

Figura 1: Imagem da área de indentação no CP representado pela marcação na forma de losango central localizado na linha média vertical entre as duas marcações verticais paralelas.



Teste de formação de biofilme nos Corpos de Provas

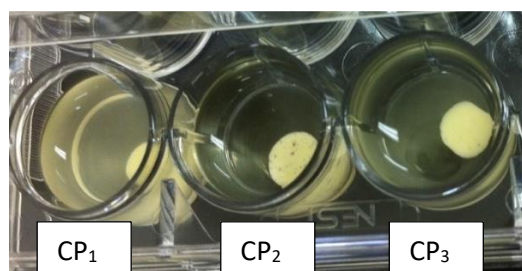
Na avaliação do teste de formação de biofilme nos CP, todos os isolados (*C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) do grupo 1 (CP1) foram capazes de formar biofilme nas três diluições propostas. Já os CP do grupo CP2 (CPC) e CP3 (C₁₆MImCl) foram capazes de inibir o crescimento do biofilme na superfície, conforme demonstrado na Tabela 2. Contudo, o CP2 não inibiu o crescimento do isolado de *C. tropicalis* (72P) na diluição 10⁻¹. Já o CP3 não apresentou inibição de crescimento do biofilme para o isolado de *C. glabrata* (RL24) nas diluições 10⁻¹ e 10⁻² e para *C. parapsilosis* (RL11) na diluição 10⁻¹. A figura 2 demonstra os CP após 72 de incubação frente aos isolados testados.

Tabela 2: Resultados da inibição do crescimento de biofilme nos corpos de prova

	*CP1			**CP ₂			CP ₃		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
<i>C. glabrata</i> (RL22)	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> (RL24)	+++	+++	+++	-	-	-	+	-	-
<i>C. glabrata</i> (RL25)	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> (57A)	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> (72A)	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> (72P)	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (RL11)	+++	+++	+++	-	-	-	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (RL20)	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (RL32)	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-

*CP1: CIV, controle de crescimento; **CP2: CIV+CPC, ***CP3: CIV+ C₁₆MImCl - crescimento negativo, + crescimento 01 colônia; ++ crescimento de 2-5 colônias; +++ crescimento > 05 colônias

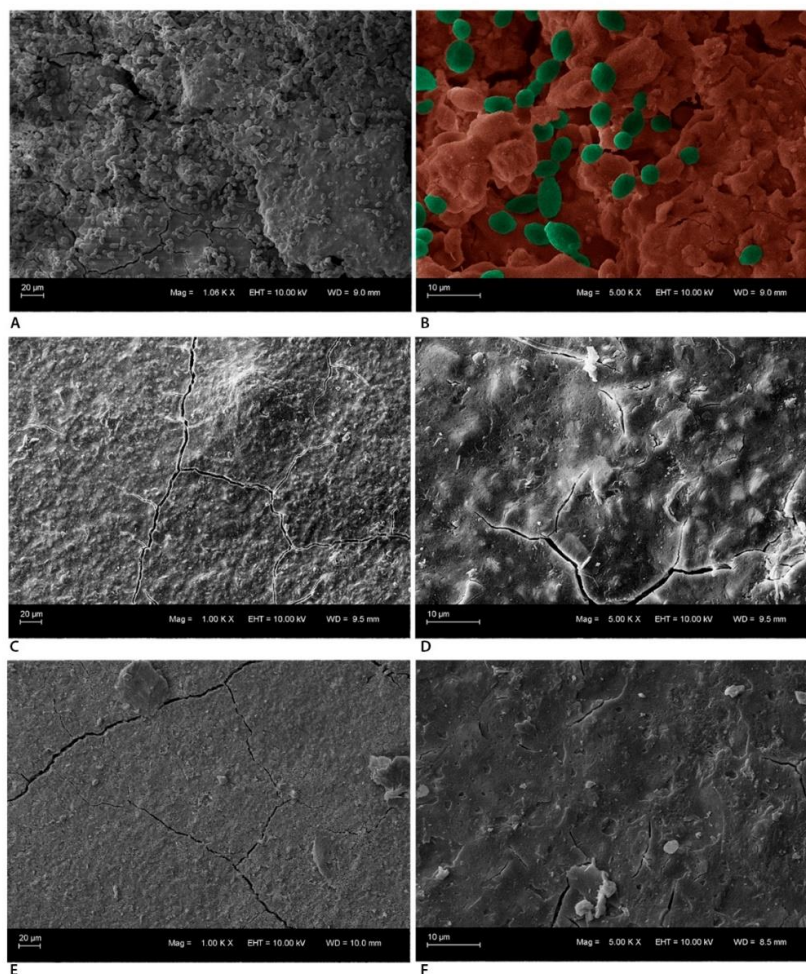
Figura 2: Corpo de prova em placa de cultura celular após 72h de incubação a 35°C em inóculo fúngico de *C. glabrata* (RL25), indicando positividade de crescimento por meio de turvação no PB₁ e ausência de crescimento nos poços de incubação do PB₂ e PB₃.



Avaliação da atividade antibiofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os resultados do teste de formação/inibição de biofilme realizados nos três CPs propostos no estudo foram confirmados por MEV. Na figura 3 foi verificada a superfície do CP₁ (GIC) com formação do biofilme, sendo visualizadas células fúngicas e ECM (Figura 3 **a** e **b**). Já a estrutura da superfície do CP₂ (Figura 3 **c** e **d**) e do CP₃ (Figura 3 **e** e **f**) foi verificado a completa inibição da formação do biofilme, visto que as superfícies não apresentaram positividade para formação de células e EMC, confirmando os achados preliminares de ausência de turvação do meio contendo o inóculo e ausência do crescimento em placa.

Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície dos CPs testados frente ao isolado de *C. tropicalis* (72A). *a* e *b*: CIV confeccionado conforme apresentação do fabricante com desenvolvimento de biofilme na sua superfície, aumento de 1000 e 5000 X respectivamente; *c* e *d*: CIV acrescido de CPC (10 ppm p/p) confeccionado conforme orientações do fabricante, sem desenvolvimento de biofilme na sua superfície, aumento de 1000 e 5000 X respectivamente; *e* e *f*: CIV acrescido de C₁₆MImCl (10 ppm p/p) confeccionado conforme orientações do fabricante, sem desenvolvimento de biofilme na sua superfície, aumento de 1000 e 5000 X respectivamente.



Avaliação de Hipoalergenicidade – teste HET-CAM

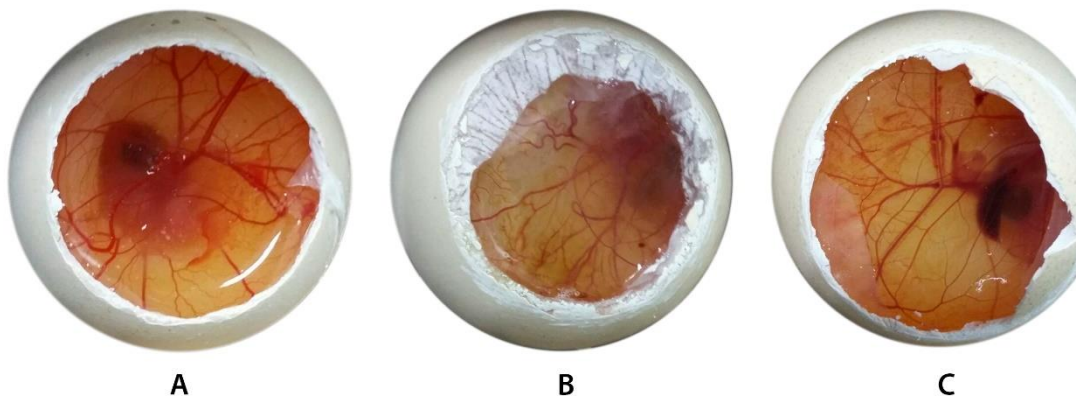
A avaliação da alergenicidade dos três compostos testados não apresentou indícios de alteração tecidual (Figura 4), pois a membrana cório-alantóide dos ovos utilizados no estudo permaneceu intacta, não sendo evidenciada em nenhum dos testes a presença de hemólise, lise celular e coagulação (Tabela 3 e figura 4).

Tabela 3: Resultados do teste HET-CAM aplicado ao CP₁, CP₂ e CP₃.

	CP ₁ (CIV)	CP ₂ (CIV + CPC)	CP ₃ (CIV + C ₁₆ MImCl)
Hemolysis	ND	ND	ND
Cell lysis	ND	ND	ND
Coagulation	ND	ND	ND

ND – Não detectável (0 seg)

Figura 4: Imagem do Teste HET-CAM mostrando ovos sem a parte superior da casca removida com exposição da membrana cório-alantóide. Os três compostos testados no estudo (A: CIV; B: CIV + CPC; C: CIV + C₁₆MImCl) administrados na forma de pó, não provocaram lesão sobre a estrutura vascular dos ovos.



DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado a modificação de uma marca comercial de CIV com larga utilização no campo odontológico, com o objetivo de compor um novo biomaterial com atividade antibiofilme fúngico. A hipótese testada pelos nossos estudos apresentou resultado promissor, pois o biomaterial testado manteve suas características físicas e apresentou ação antibiofilme. Algumas marcas de CIV comercial modificadas com objetivo de apresentarem ação antimicrobiana, não demonstraram efeito inibitório sobre biofilme fúngico de *C. albicans* (Bhavana *et al*,

2015). O risco potencial das infecções pelo gênero *Candida* (*C. albicans* e não-*albicans*) pode ser demonstrado pela capacidade de isolados da cavidade oral terem potencial de formar biofilme similar aos isolados de candidíases invasivas. Esta condição foi demonstrada em modelo de infecção de *Galleria mellonella* em pacientes HIV positivos (Junqueira *et al*, 2011), sendo que este modelo pode sem muitas restrições, ser extrapolado para a população em geral.

Após a incorporação do CPC e do C₁₆MImCl no pó de vidro e reação de polimerização, a avaliação do teste de deformação plástica nos corpos de prova não apresentou variação, indicando a manutenção da microdureza dos compostos, pois conforme apresentado na tabela 1, os CP2 e CP3 não tiveram variação de valores ($p < 0,05$) em relação ao CP1 (grupo controle). Farret *et al* (2012) avaliando a microdureza nas mesmas condições de teste encontrou resultados superiores aos achados no nosso estudo, o que pode ser indicada pelo fato dos CPs apresentarem moldagem distinta nos dois estudos. Bertolini *et al* (2010), aferindo a existência de redução da microdureza de CIVs frente a formação de biofilme de isolados de *C. albicans*, observou resultados em discordância aos nossos, possivelmente devido a diferença de marca e do tipo de constituição do CIV. Esta diferença foi também evidenciada em um estudo realizado por Tüzüner e Ulusu (2012) no qual foi incorporado em uma marca diferente da utilizada nesta pesquisa e em uma quantidade de 2% (p/p) de CPC no CIV, constatando redução da microdureza.

Na avaliação do teste de inibição da formação do biofilme, o CIV na sua composição original não teve a capacidade de inibir em nenhum dos isolados testados na metodologia proposta (Tabela 2). A rugosidade da superfície do CIV pode ser considerado um fator relevante na aderência do biofilme, pois proporciona maior adesão e fixação da EMC do biofilme à superfície do ionômero (Carlén *et al*, 2001). Mesmo considerando a capacidade anticariogênica dos CIV, esta característica está relacionada diretamente a inibição de desenvolvimento de bactérias com o *S. mutans* (Chau *et al*, 2015) havendo limitação de estudos em relação a inibição do biofilme fúngico pelos CIV na sua composição original.

Os CIV modificados acrescidos de CPC (CP₂) apresentaram um potencial inibitório significativo sobre a formação de biofilme (tabela 2), inibindo o desenvolvimento da quase totalidade dos isolados testados. O CPC é uma molécula de amônio quaternário que provoca desestruturação da composição biológica através da ligação ácido-base da molécula com componentes da parede celular (Fathilah *et*

al, 2012). Isto provoca um desequilíbrio entre os meios intra e extracelulares, com desregulação da saída do conteúdo citoplasmático, acarretando assim morte celular (Alves *et al*, 2012). Estudos indicam a efetividade da ação antibiótica do CPC em biomaterias e produtos odontológicos (Edlind *et al*, 2005; Alkawas *et al*, 2014; Santos *et al*, 2014). O CPC aderido a nanofibras mostrou potencial inibitório sobre isolados *C. albicans* em concentrações superiores a 2,5% (Santos *et al*, 2014), assim como sua presença em formulação de enxaguantes bucais demonstrou efetividade inibindo a aderência de *C. albicans* sobre as células da mucosa oral (Giuliana and Angelo, 2001). Além disso, o CPC demonstrou apresentar potencial inibitório sobre *C. tropicalis*, porém sem indicativo de perfil de resistência (Fathilah *et al*, 2012).

A estrutura similar entre C₁₆MImCl (apresentando um anel de imidazólio com carga positiva) e CPC (apresentando um anel de piridínio carregado positivamente) sugere um papel importante da cabeça catiônica na inibição de espécies patogênicas de *Candida* spp. (Bergamo *et al*, 2016). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que o mecanismo de ação do C₁₆MImCl esteja relacionado à interferência na capacidade de regeneração da membrana por diminuição da quantidade de esterol disponível na célula fúngica, provocando depleção de componentes intracelulares (Bergamo, Donato, *et al*, 2015). A anfipaticidade da parede celular apresenta uma interação físico-química favorável com o sal imidazólico (Schrekker *et al*, 2013), permitindo desta forma uma ligação efetiva e ação inibitória sobre a formação do biofilme. Além disso, estudos realizados já demonstraram a capacidade antibiofilme do C₁₆MImCl, em testes *in vitro*, avaliando a CIM e a inserção do composto em estruturas poliméricas como bases resinosas e cateteres (Bergamo *et al*, 2014; Bergamo *et al*, 2016).

Bergamo, Balbuena, *et al* (2015) compararam a ação do C₁₆MImCl e do C₁₆MImMeS com a CHX, que atualmente é o antimicrobiano mais comumente referenciado em pesquisas com biomaterias (De Castilho *et al*, 2013; Alkawas *et al*, 2014; Hook *et al*, 2014; Barros *et al*, 2015). Os dois sais imidazólicos demonstraram ação antibiofilme em concentrações bem menores que a CHX frente aos isolados de *C. tropicalis*. A eficácia do uso do C₁₆MImCl em enxaguantes bucais também foi evidenciada, tendo sua ação comparada ao CPC, que é o composto usualmente utilizado neste tipo de produto, demonstrando uma efetividade de ação em concentrações 10 vezes menores sobre a inibição da formação de biofilme de *Candida* em resinas acrílicas (Bergamo *et al*, 2016). Dalla Lana *et al* (2015) demonstraram a

ação do C₁₆MImCl e do C₁₆MImMeS sobre isolados multiresistentes de dermatófitos. Além disso, o C₁₆MImCl apresentou potencial inibitório sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Fusarium graminearum*, indicando sua eficácia *in vivo* para a supressão dos sintomas da doença e infecção de grãos em plantas de trigo conhecida como giberela (Ribas *et al*, 2016). Todos estes achados sugerem que os sais imidazólicos apresentam amplo espectro de ação, principalmente sobre isolados multirresistentes de várias espécies fúngicas.

Considerando os achados reportados na tabela 2, tanto o CPC quanto o C₁₆MImCl apresentaram um grande potencial inibitório sobre os isolados de *Candida* spp.. Os crescimentos verificados no experimento, provavelmente seriam inibidos se os CP tivessem uma concentração superior a 10ppm (concentração padronizada no nosso estudo), já que houve um crescimento limitado a uma colônia fúngica na primeira diluição. Outro fator que indica que este crescimento pode ser considerado como desprezível é que a avaliação da superfície dos CPs através da MEV indicou uma negatividade de formação de biofilme.

O teste de hipoalergenicidade realizado com o pó de vidro da formulação original do CIV e com os pós modificados acrescidos de CPC e C₁₆MImCl apresentou resultados satisfatórios, pois em nenhuma das avaliações houve lesão tecidual vascular, hemólise ou coagulação, indicando que tanto a formulação comercial quanto as modificações propostas apresentam inocuidade tecidual. Estes achados corroboram com diversos achados já descritos pela literatura sobre a biocompatibilidade destes compostos com células e tecidos humanos. Estudo publicado por Rocha *et al* (2006), referenciou que os materiais ioméricos convencionais usualmente apresentam baixo efeito citotóxico *in vitro* sobre células da linhagem odontoblástica. Os dados encontrado nesta pesquisa reforçam os achados anteriormente encontrados pelo nosso grupo indicando não haver citotoxicidade, genotoxicidade ou mutanegicidade relacionada a doses inibitórias efetivas antibiofilme do C₁₆MImCl (Schrekker *et al*, 2013; Dalla Lana *et al*, 2015) bem como ausência de efeito hipoalergênico (Bergamo *et al*, 2016).

Em suma, a inserção do C₁₆MImCl na estrutura do CIV apresentou atividade antibiofilme contra *Candida* spp. em baixas concentrações quando comparados ao CP. Este efeito foi observado através da MEV e foi constatado mudança na morfologia e dano das células sésseis no material e ao mesmo tempo foi considerado hipoalergenicidade pelo teste HET-CAM. Esse fato indica fortemente C₁₆MImCl como

um potente composto com atividade antibiofilme para o desenvolvimento de materiais a base de CIV para uso aplicado a odontologia.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, Patrícia; Casadevall A (2015). NIH Public Access. *Med Mycol* **50**: 337–345.
- Alkawas S, Al Zubaidi E, Adel O, Rahman B, Hawas N (2014). Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of tea tree oil mouthwash and a cetylpyridinium chloride mouthwash: A randomized controlled crossover study. *Contemp Clin Dent* **5**: 466.
- Alves D, Costa AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A (2012). Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. *Rev Port Estomatol Med Dent e Cir Maxilofac* **53**: 181–189.
- Araújo GRDS, Fontes GN, Leão D, *et al* (2016). Cryptococcus neoformans capsular polysaccharides form branched and complex filamentous networks viewed by high-resolution microscopy. *J Struct Biol* **193**: 75–82.
- Barros J, Grenho L, Fernandes MH, *et al* (2015). Anti-sessile bacterial and cytocompatibility properties of CHX-loaded nanohydroxyapatite. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **130**: 305–314.
- Bergamo VZ, Balbuena E a., Hatwig C, *et al* (2015). 1- *n* -Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. *Lett Appl Microbiol* **61**: 504–510.
- Bergamo VZ, Donato RK, Dalla Lana DF, *et al* (2015). Imidazolium salts as antifungal agents: Strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. *Lett Appl Microbiol* **60**: 66–71.
- Bergamo VZ, Donato RK, Nemitz MC, *et al* (2016). Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation. *J Appl Microbiol* **121**: 1558–1567.
- Bertolini MM, de Oliveira G, Charone S, Soares RM de A, de Souza IPR, Portela MB (2010). Avaliação in vitro da Microdureza de Cimentos de Ionômero de Vidro Modificados por Resina Submetidos a Biofilme de *Candida albicans*. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr* **10**: 249–255.
- Bhavana V, Chaitanya KP, Gandi P, Patil J, Dola B, Reddy RB (2015). Evaluation of

- antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. *J Conserv Dent* **18**: 44–6.
- Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* **34**: 8533–8554.
- Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J (2001). Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* **22**: 481–487.
- De Castilho ARF, Duque C, Negrini TDC, *et al* (2013). In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent* **41**: 155–163.
- Chau NPT, Pandit S, Cai JN, Lee MH, Jeon JG (2015). Relationship between fluoride release rate and anti-cariogenic biofilm activity of glass ionomer cements. *Dent Mater* **31**: e100–e108.
- Chung PY, Toh YS (2014). Anti-biofilm agents : recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis*: 231–239.
- Cross D, Eide ML, Kotinas A (2010). The clinical features of angular cheilitis occurring during orthodontic treatment: a multi-centre observational study. *J Orthod* **37**: 80–86.
- Czerninski R, Pikovsky A, Gati I (2015). Comparison of the efficacy of a novel sustained release clotrimazole varnish and clotrimazole troches for the treatment of oral candidiasis. : 467–473.
- Dalla Lana DF, Donato RK, Bündchen C, *et al* (2015). Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. *J Appl Microbiol* **119**: 377–388.
- Dar-Odeh N, Shehabi A, Al-Bitar Z, *et al* (2011). Oral *Candida* colonization in patients with fixed orthodontic appliances: The importance of some nutritional and salivary factors. *African J Microbiol Res* **5**: 2150–2154.
- Deepalakshmi M, Poorni S, Miglani R, Rajamani I, Ramachandran S (2010). Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass ionomer cements containing chlorhexidine and cetrimide: an in-vitro study. *Indian J Dent Res* **21**: 552–556.
- Dhanasekaran D, Vinothini K, Latha S, Thajuddin N, Panneerselvam A (2014). Human dental biofilm: Screening, characterization, in vitro biofilm formation and antifungal resistance of *Candida* spp. *Saudi J Dent Res* **5**: 55–70.

- Edlind MP, Smith WL, Edlind TD (2005). Effects of Cetylpyridinium Chloride Resistance and Treatment on Fluconazole Activity versus *Candida albicans*. *Effects of Cetylpyridinium Chloride Resistance and Treatment on Fluconazole Activity versus Candida albicans*. **49**: 2–5.
- Fanning S, Mitchell AP (2012). Fungal Biofilms. *Plos Pathog* **8**: 1–4.
- Farret MM, Lima EM De, Mota EG, Oshima HMS, Maguilnik G, Scheid PA (2012). Assessment of the mechanical properties of glass ionomer cements for orthodontic cementation. **17**: 154–159.
- Fathilah AR, Himratul-Aznita WH, Fatheen ARN, Suriani KR (2012). The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride on oral *Candida*. *J Dent* **40**: 609–615.
- Giuliana GPG, Angelo MEMMD (2001). Effect of antimicrobial mouthrinses on the in vitro adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *J Oral Pathol Med*: 172–176.
- Harriott MM, Noverr MC (2011). Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol* **19**: 557–563.
- Hibino K, Wong RWK, HÄgg U, Samaranayake LP (2009). The effects of orthodontic appliances on *Candida* in the human mouth. *Int J Paediatr Dent* **19**: 301–308.
- Hook ER, Owen OJ, Bellis C a, Holder J a, O’Sullivan DJ, Barbour ME (2014). Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. *J Nanobiotechnology* **12**: 3.
- ICCVAM (2010). ICCVAM-Recommended Test Method Protocol : Hen ’ s Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method.
- Jäger E, Donato RK, Perchacz M, *et al* (2015). Biocompatible succinic acid-based polyesters for potential biomedical applications: fungal biofilm inhibition and mesenchymal stem cell growth. *RSC Adv* **5**: 85756–85766.
- Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, *et al* (2011). Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol* **11**: 247.
- Khanpayeh E, Jafari AA, Tabatabaei Z (2014). Comparison of salivary *Candida* profile in patients with fixed and removable orthodontic appliances therapy. *Iran J Microbiol* **6**: 263–268.
- Kim D-A, Abo-Mosallam H, Lee H-Y, Lee J-H, Kim H-W, Lee H-H (2015). Biological

- and mechanical properties of an experimental glass-ionomer cement modified by partial replacement of CaO with MgO or ZnO. *J Appl Oral Sci* **23**: 369–375.
- Klaus K, Eichenauer J, Sprenger R, Ruf S (2016). Oral microbiota carriage in patients with multibracket appliance in relation to the quality of oral hygiene. *Head Face Med* **12**: 28.
- Leonhard M, Tobudic S, Moser D, Zatorska B, Bigenzahn W, Schneider-Stickler B (2013). Growth kinetics of candida biofilm on medical polymers: A long-term in vitro study. *Laryngoscope* **123**: 732–737.
- Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S (2014). Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *Int J Antimicrob Agents* **43**: 395–402.
- Paradella T (2004). Cimentos de Ionômero de Vidro na Odontologia Moderna. *Rev Odontol UNESP* **33**: 157–16.
- Pasqualotto AC, Thiele KO, Goldani LZ (2010). Novel triazole antifungal drugs: focus on isavuconazole, ravuconazole and albaconazole. *Curr Opin Investig Drugs* **11**: 165–74.
- Ramage G, Rajendran R, Sherry L, *et al* (2012). Fungal Biofilm Resistance. *Int J Microbiol* **2012**.
- Ratson T, Greenstein RB-N, Mazor Y, Peretz B (2009). Salivary *Candida*, Caries and *Candida* in Toothbrushes. *Dent Abstr* **54**: 219–220.
- Ribas AD, Del Ponte EM, Dalbem AM, *et al* (2016). Imidazolium salts with antifungal potential for the control of head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *J Appl Microbiol* **121**: 445–452.
- Rocha L, Aparecida EM, Fábio AM, Souza CA De (2006). Citotoxicidade de cimentos de ionômero de vidro restauradores sobre células de linhagem odontoblástica. *Cell*.
- Santos VA Dos, Viera PVA, Oliveira AM de, Zanin MHA, Borsatt MA (2014). Antifungal effect of electrospun nanofibers containing cetylpyridinium chloride against *Candida albicans*. *Braz Oral Res* **28**: 1–6.
- Schrekker HS, Donato RK, Fuentefria AM, *et al* (2013). Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. *Medchemcomm* **4**: 1457.
- Schrekker CML, Sokolovicz YCA, Raucci MG, *et al* (2016). Multitask Imidazolium Salt

- Additives for Innovative Poly(L-lactide) Biomaterials: Morphology Control, *Candida* spp. Biofilm Inhibition, Human Mesenchymal Stem Cell Biocompatibility, and Skin Tolerance. *ACS Appl Mater Interfaces* **8**: 21163–21176.
- Silva RM, Pereira F V., Mota FAP, Watanabe E, Soares SMCS, Santos MH (2016). Dental glass ionomer cement reinforced by cellulose microfibers and cellulose nanocrystals. *Mater Sci Eng C* **58**: 389–395.
- Silva RJ da, Queiroz MS De, Ribeiro TT de F, Silva CHV da, Beatrice LC de S (2010). Propriedades dos cimentos de ionômero de vidro : uma revisão sistemática. *Odontol Clínica e Científica* **9**: 125–129.
- Simmons JO, Meyers EJ, Lien W, Banfield RL, Roberts HW, Vandewalle KS (2016). Effect of surface treatments on the mechanical properties and antimicrobial activity of desiccated glass ionomers. *Dent Mater* **32**: 1343–1351.
- Tüzüner T, Ulusu T (2012). Effect of antibacterial agents on the surface hardness of a conventional glass-ionomer cement. *J Appl Oral Sci* **20**: 45–49.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada a modificação de uma marca comercial de CIV com larga utilização no campo odontológico, com o objetivo de compor um novo biomaterial com atividade antibiofilme fúngico. A hipótese testada pelos nossos estudos apresentou resultado promissor, pois o biomaterial testado manteve suas características físicas e apresentou ação antibiofilme no tempo proposto no estudo. Algumas marcas de CIV comercial modificadas com objetivo de apresentarem ação antimicrobiana, não demonstraram efeito inibitório sobre biofilme fúngico de *C. albicans* (BHAVANA et al., 2015). O risco potencial das infecções pelo gênero *Candida* (*C. albicans* e não-*albicans*) pode ser demonstrado pela capacidade de isolados da cavidade oral terem potencial de formar biofilme similar aos isolados de candidíases invasivas. Esta condição foi demonstrada em modelo de infecção de *Galleria mellonella* em pacientes HIV positivos (JUNQUEIRA et al., 2011), sendo que este modelo pode sem muitas restrições, ser extrapolado para a população em geral.

Após a incorporação do CPC e do C₁₆MIImCl no pó de vidro e reação de polimerização, a avaliação do teste de deformação plástica nos corpos de prova não apresentou variação, indicando a manutenção da microdureza dos compostos, pois conforme apresentado na Tabela 1 do artigo, os CP2 e CP3 não tiveram variação de valores em relação ao CP1 (grupo controle). Farret et al (2012) avaliando a microdureza nas mesmas condições de teste encontraram resultados superiores aos achados no nosso estudo, o que pode ser indicado pelo fato dos CPs apresentarem moldagem distinta nos dois estudos. Bertolini et al (2010), aferindo a existência de redução da microdureza de CIVs frente a formação de biofilme de isolados de *C. albicans*, observaram resultados em discordância aos nossos, possivelmente devido a diferença de marca e do tipo de constituição do CIV. Esta diferença foi também evidenciada em um estudo realizado por Tüzüner e Ulusu (2012) no qual foi incorporado em uma marca diferente da utilizada nesta pesquisa e em uma quantidade de 2% (p/p) de CPC no CIV, constatando redução da microdureza.

Na avaliação do teste de inibição da formação do biofilme, o CIV na sua composição original não teve a capacidade de inibir em nenhum dos isolados testados na metodologia proposta (Tabela 2 do artigo). A rugosidade da superfície do CIV pode ser considerado um fator relevante na aderência do biofilme, pois proporciona maior adesão e fixação da EMC do biofilme à superfície do ionômero (CARLÉN et al., 2001).

Mesmo considerando a capacidade anticariogênica dos CIV, esta característica está relacionada diretamente a inibição de desenvolvimento de bactérias como *S. mutans* (CHAU et al., 2015) havendo limitação de estudos em relação a inibição do biofilme fúngico pelos CIV na sua composição original.

Os CIV modificados acrescidos de CPC (CP₂) apresentaram um potencial inibitório significativo sobre a formação de biofilme (Tabela 2), inibindo o desenvolvimento da quase totalidade dos isolados testados. O CPC é uma molécula de amônio quaternário que provoca desestruturação da composição biológica através da ligação ácido-base da molécula com componentes da parede celular (FATHILAH et al., 2012). Isto provoca um desequilíbrio entre os meios intra e extracelulares, com desregulação da saída do conteúdo citoplasmático, acarretando assim morte celular (ALVES et al., 2012). Estudos indicam a efetividade da ação antibiótica do CPC em biomateriais e produtos odontológicos (ALKAWAS et al., 2014; EDLIND; SMITH; EDLIND, 2005; SANTOS et al., 2014). O CPC aderido a nanofibras mostrou potencial inibitório sobre isolados de *C. albicans* em concentrações superiores a 2,5% (SANTOS et al., 2014), assim como sua presença em formulação de enxaguantes bucais demonstrou efetividade inibindo a aderência de *C. albicans* sobre as células da mucosa oral (GIULIANA; ANGELO, 2001). Além disso, o CPC demonstrou apresentar potencial inibitório sobre *C. tropicalis*, porém sem indicativo de perfil de resistência (FATHILAH et al., 2012).

A estrutura similar entre C₁₆MImCl (apresentando um anel de imidazólio com carga positiva) e CPC (apresentando um anel de piridínio carregado positivamente) sugere um papel importante da cabeça catiônica na inibição de espécies patogênicas de *Candida* spp. (Bergamo et al, 2016). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que o mecanismo de ação do C₁₆MImCl esteja relacionado à interferência na capacidade de regeneração da membrana por diminuição da quantidade de esterol disponível na célula fúngica, provocando depleção de componentes intracelulares (BERGAMO et al., 2015a). A anfipaticidade da parede celular apresenta uma interação físico-química favorável com o sal imidazólico (SCHREKKER et al., 2013), permitindo desta forma uma ligação efetiva e ação inibitória sobre a formação do biofilme. Além disso, estudos realizados já demonstraram a capacidade antibiofilme do C₁₆MImCl, em testes *in vitro*, avaliando a CIM e a inserção do composto em estruturas poliméricas como bases resinosas e cateteres (Bergamo et al, 2014; Bergamo et al, 2016).

Bergamo, Balbuena, *et al* (2015) compararam a ação do C₁₆MImCl e do C₁₆MImMeS com a CHX, que atualmente é o antimicrobiano mais comumente referenciado em pesquisas com biomateriais (ALKAWAS *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2015; DE CASTILHO *et al.*, 2013; HOOK *et al.*, 2014). Os dois sais imidazólicos demonstraram ação antibiofilme em concentrações bem menores que a CHX frente aos isolados de *C. tropicalis*. A eficácia do uso do C₁₆MImCl em enxaguantes bucais também foi evidenciada, tendo sua ação comparada ao CPC, que é o composto usualmente utilizado neste tipo de produto, demonstrando uma efetividade de ação em concentrações 10 vezes menores sobre a inibição da formação de biofilme de *Candida* em resinas acrílicas (BERGAMO *et al.*, 2016). Dalla Lana *et al* (2015) demonstraram a ação do C₁₆MImCl e do C₁₆MImMeS sobre isolados multirresistentes de dermatófitos. Além disso, o C₁₆MImCl apresentou potencial inibitório sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Fusarium graminearum*, indicando sua eficácia *in vivo* para a supressão dos sintomas da doença e infecção de grãos em plantas de trigo conhecida como giberela (RIBAS *et al.*, 2016). Todos estes achados sugerem que os sais imidazólicos apresentam amplo espectro de ação, principalmente sobre isolados multirresistentes de várias espécies fúngicas.

Considerando os achados reportados na tabela 2, tanto o CPC quanto o C₁₆MImCl apresentaram um grande potencial inibitório sobre os isolados de *Candida* spp.. Os crescimentos verificados no experimento, provavelmente seriam inibidos se os CP tivessem uma concentração superior a 10ppm (concentração padronizada no nosso estudo), já que houve um crescimento limitado a uma colônia fúngica na primeira diluição. Outro fator que indica que este crescimento pode ser considerado como desprezível é que a avaliação da superfície dos CPs através da MEV indicou uma negatividade de formação de biofilme.

O teste de hipoalergenicidade realizado com o pó de vidro da formulação original do CIV e com os pós modificados acrescidos de CPC e C₁₆MImCl apresentou resultados satisfatórios, pois em nenhuma das avaliações houve lesão tecidual vascular, hemólise ou coagulação, indicando que tanto a formulação comercial quanto as modificações propostas apresentam inocuidade tecidual. Estes achados corroboram com diversos achados já descritos pela literatura sobre a biocompatibilidade destes compostos com células e tecidos humanos. Estudo publicado por Rocha *et al* (2006), referenciou que os materiais iônicos convencionais usualmente apresentam baixo efeito citotóxico *in vitro* sobre células da

linhagem odontoblástica. Os dados encontrado nesta pesquisa reforçam os achados anteriormente encontrados pelo nosso grupo indicando não haver citotoxicidade, genotoxicidade ou mutanegicidade relacionada a doses inibitórias efetivas antibiofiome do C₁₆MImCl (DALLA LANA et al., 2015; SCHREKKER et al., 2013) bem como ausência de efeito hipoalergênico (BERGAMO et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

A inserção do C₁₆MImCl na estrutura do CIV apresentou atividade antibiofilme efetiva em baixas concentrações contra cepas multirresistentes de *Candida* spp.. Este efeito foi observado através de resultados negativos do crescimento das cepas testadas, confirmados por MEV, verificando-se mudança na morfologia e dano das células sésseis no material.

A avaliação da propriedade física da deformação plástica do biomaterial proposto indicou não haver mudanças nas características do composto. Além destes achados, o teste HET-CAM indicou que o CIV modificado com C₁₆MImCl apresentou característica de hipoalergenicidade.

A busca por novas moléculas com atividade antifúngica, associada a toxicidade reduzida, indica fortemente o C₁₆MImCl como um potente composto com atividade antibiofilme para o desenvolvimento de materiais a base de CIV para uso aplicado a odontologia.

Com base nos achados, sugere-se que estudos clínicos possam ser realizados para avaliar a efetividade clínica do material, associado a sua inserção em outros produtos de uso odontológico, bem como testar sua efetividade contra outros agentes potencialmente patogênicos.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-ZAPATA, D.; PETRAITIENE, R.; PETRAITIS, V. Echinocandins: the expanding antifungal armamentarium. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. Suppl 6, p. S604–S611, 2015.
- AL-SHAYYAB, M. H. et al. Antifungal prescribing pattern and attitude towards the treatment of oral candidiasis among dentists in Jordan. **International Dental Journal**, n. 65, p. 216–226, 2015.
- ALBUQUERQUE, PATRÍCIA; CASADEVALL, A. NIH Public Access. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337–345, 2015.
- ALKAWAS, S. et al. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of tea tree oil mouthwash and a cetylpyridinium chloride mouthwash: A randomized controlled crossover study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 5, n. 4, p. 466, 2014.
- ALVES, D. et al. Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentaria e Cirurgia Maxilofacial**, v. 53, n. 3, p. 181–189, 2012.
- ARAÚJO, G. R. D. S. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides form branched and complex filamentous networks viewed by high-resolution microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 193, p. 75–82, 2016.
- ARAUJO, J. E. T. et al. Candidíase invasiva e alterações bucais em recém-nascidos prematuros Invasive candidiasis and oral manifestations in premature newborns. **Einstein**, v. 11, n. 1, p. 71–75, 2013.
- AYDOGAN, F. et al. The use of glass ionomer cement in the reconstruction of the dorsal L- strut: an experimental study on rabbits. **Laryngoscope**, v. 124, n. 8, p. E303–8 1p, 2014.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 397–403, 2000.
- BARBOSA, M. B.; FARIA, M. G. I. PRODUTOS NATURAIS COMO NOVA ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO FOR THE TREATMENT OF ORAL CANDIDIASIS. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 1, p. 103–107, 2014.
- BARROS, J. et al. Anti-sessile bacterial and cytocompatibility properties of CHX-loaded nanohydroxyapatite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 305–314, 2015.
- BEN ABDELJELIL, J. et al. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from patients and health care workers in a neonatal intensive care unit. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 5, p. 1235–1249, 2011.
- BENDAHA, H. et al. New azole antifungal agents with novel modes of action:

synthesis and biological studies of new tridentate ligands based on pyrazole and triazole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4117–4124, 2011.

BERGAMO, V. Z. et al. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 66–71, 2015a.

BERGAMO, V. Z. et al. 1- *n* -Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 504–510, 2015b.

BERGAMO, V. Z. et al. Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1558–1567, 2016.

BERTOLINI, M. M. et al. Avaliação in vitro da microdureza de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina submetidos a biofilme de *Candida albicans*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 10, n. 2, p. 249–255, 2010.

BHAVANA, V. et al. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. **Journal of Conservative Dentistry**, 2015.

BIRMAN, E. G. DO Oral Cancer and Candida. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 3, p. 279–282, 2000.

BORGHI, E. New strategic insights into managing fungal biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. October, p. 1–6, 2015.

BOROS-MAJEWSKA, J. et al. Novel Nystatin A1 derivatives exhibiting low host cell toxicity and antifungal activity in an in vitro model of oral candidosis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, n. 5, p. 341–355, 2014.

BRUSCAA, M. I.; A.C.ROSA, ; O. CHARAB ; L. STERIN-BORDAC ; Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. **Angle Orthodontist**, v. 77, n. 2, 2007.

CALVO, A. F. B. et al. Glass ionomer cements bond stability in caries-affected primary dentin. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 48, p. 183–187, 2014.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8533–8554, 2013.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, 2009.

CANNON, R. D.; HOLMES, A. R. Learning the ABC of oral fungal drug resistance. **Molecular Oral Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 425–437, 2015.

CARLÉN, A. et al. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. **Biomaterials**, v. 22, n. 5, p. 481–487, 2001.

CARVALHINHO, S. et al. Susceptibilities of *Candida albicans* mouth isolates to antifungal agents, essential oils and mouth rinses. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 69–76, 2012.

CASTRO, R. D. DE et al. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity : an in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 417, p. 1–8, 2015.

CAVASSANI, V. G. D. S. et al. Candidíase oral como marcador de prognóstico em pacientes portadores do HIV. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, n. 5, p. 630–634, 2002.

CHARLES, C. Bonding orthodontic brackets with glass-ionomer cement. **Biomaterials**, v. 19, n. 6, p. 589–591, 1998.

CHARONE, S. et al. Biofilm of *Candida albicans* from oral cavity of an HIV-infected child: Challenge on enamel microhardness. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 115, n. 4, p. 500–504, 2013.

CHAU, N. P. T. et al. Relationship between fluoride release rate and anti-cariogenic biofilm activity of glass ionomer cements. **Dental Materials**, v. 31, n. 4, p. e100–e108, 2015.

CHUNG, P. Y.; TOH, Y. S. Anti-biofilm agents : recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and Disease**, n. 70, p. 231–239, 2014.

COAD, B. R. et al. Biomaterials surfaces capable of resisting fungal attachment and biofilm formation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 296–307, 2014.

CORRÊA, L. G. P.; OGASAWARA, T. Estudos comparativos de alguns cimentos ionoméricos convencionais. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 11, n. 3, p. 297–305, 2006.

CORTÉS, J. A; RUSSI, J. A. Equinocandinas. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 28, n. 6, p. 529–536, 2011.

CROSS, D.; EIDE, M. L.; KOTINAS, A. The clinical features of angular cheilitis occurring during orthodontic treatment: a multi-centre observational study. **J Orthod**, v. 37, n. 2, p. 80–86, 2010.

CZERNINSKI, R.; PIKOVSKY, A.; GATI, I. Comparison of the efficacy of a novel sustained release clotrimazole varnish and clotrimazole troches for the treatment of oral candidiasis. p. 467–473, 2015.

DALLA LANA, D. F. et al. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 377–388, 2015.

- DAR-ODEH, N. et al. Oral *Candida* colonization in patients with fixed orthodontic appliances: the importance of some nutritional and salivary factors. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 15, p. 2150–2154, 2011.
- DE CASTILHO, A. R. F. et al. In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 2, p. 155–163, 2013.
- DEEPALAKSHMI, M. et al. Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass ionomer cements containing chlorhexidine and cetrimide: an in-vitro study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 21, n. 4, p. 552–556, 2010.
- DHANASEKARAN, D. et al. Human dental biofilm: screening, characterization, in vitro biofilm formation and antifungal resistance of *Candida* spp. **Saudi Journal for Dental Research**, v. 5, n. 1, p. 55–70, 2014.
- EDLIND, M. P.; SMITH, W. L.; EDLIND, T. D. Effects of cetylpyridinium chloride resistance and treatment on fluconazole activity versus *Candida albicans* effects of cetylpyridinium chloride resistance and treatment on fluconazole activity versus *Candida albicans*. **American Society for Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 2–5, 2005.
- EL-AZIZI, M.; FARAG, N.; KHARDORI, N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 21, p. 1–9, 2012.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1–4, 2012.
- FARRET, M. M. et al. Assessment of the mechanical properties of glass ionomer cements for orthodontic cementation. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 17, n. 6, p. 154–159, 2012.
- FATHILAH, A. R. et al. The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride on oral *Candida*. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 7, p. 609–615, 2012.
- FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews**, v. 9, n. FEBRUARY, 2011.
- FOOK, A. C. B. M. et al. Materiais odontológicos : cimentos de ionômero de vidro. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 1, p. 40–45, 2008.
- FORASTIERO, A. et al. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4769–4781, 2013.
- GAUCH, L. M. R. ET AL. Relationship among local and functional factors in the development of denture stomatitis in denture wearers in northern Brazil. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, n. 5, p. 314–318, 2014.
- GIULIANA, G. P. G.; ANGELO, M. E. M. M. D. Effect of antimicrobial mouthrinses on

the in vitro adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, p. 172–176, 2001.

GÜNDÜZ ARSLAN, S. et al. One-year follow-up of the effect of fixed orthodontic treatment on colonization by oral candida. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 1, p. 26–29, 2008.

HÄGG, U. et al. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. **European Journal of Orthodontics**, v. 26, n. 6, p. 623–629, 2004.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 557–563, 2011.

HIBINO, K. et al. The role of salivary factors in persistent oral carriage of *Candida* in humans. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 7, p. 678–683, 2009a.

HIBINO, K. et al. The effects of orthodontic appliances on *Candida* in the human mouth. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 19, n. 5, p. 301–308, 2009b.

HOCK, K. T. J. Conference paper. **Seminar Budaya Iban**, n. 2, p. 116–125, 1988.

HOOK, E. R. et al. Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 3, 2014.

IBRAHIM, N. H. et al. The effect of antifungal combination on transcripts of a subset of drug-resistance genes in clinical isolates of *Candida* species induced biofilms. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 1, p. 55–66, 2015.

ICCVAM. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol : Hen ' s Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. n. 10, 2010.

JÄGER, E. et al. Biocompatible succinic acid-based polyesters for potential biomedical applications: fungal biofilm inhibition and mesenchymal stem cell growth. **RSC Advances**, v. 5, n. 104, p. 85756–85766, 2015.

JESSICA A. ANDES, D. R. T. H. T. . M. K. F. E. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance Access. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1–19, 2014.

JUNQUEIRA, J. C. et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 247, 2011.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

KELLER, P. et al. An antifungal benzimidazole derivative inhibits ergosterol biosynthesis and reveals novel sterols. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6296–6307, 2015.

- KHANPAYEH, E.; JAFARI, A. A.; TABATABAEI, Z. Comparison of salivary *Candida* profile in patients with fixed and removable orthodontic appliances therapy. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 263–268, 2014.
- KIM, D.-A. et al. Biological and mechanical properties of an experimental glass-ionomer cement modified by partial replacement of CaO with MgO or ZnO. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 4, p. 369–375, 2015.
- KLAUS, K. et al. Oral microbiota carriage in patients with multibracket appliance in relation to the quality of oral hygiene. **Head & Face Medicine**, v. 12, n. 1, p. 28, 2016.
- KRAWIECKA, E. et al. Ocena stanu jamy ustnej i wyst ę powania. **Dental Forum**, v. 1, p. 21–25, 2013.
- KURNATOWSKI, P.; MOQBIL, S.; KACZMARCZYK, D. Signs, symptoms and the prevalence of fungi detected from the oral cavity and pharynx of radiotherapy subjects with head and neck tumors, and their susceptibility to chemotherapeutics. **Annals of Parasitology**, v. 60, n. 3, p. 207–213, 2014.
- LEÃO, J. C.; GOMES, V. B.; PORTER, S. Ulcerative lesions of the mouth: an update for the general medical practitioner. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 62, n. 6, p. 769–780, 2007.
- LEONHARD, M. et al. Growth kinetics of candida biofilm on medical polymers: A long-term in vitro study. **Laryngoscope**, v. 123, n. 3, p. 732–737, 2013.
- LIU, S. et al. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 395–402, 2014.
- LUÍSA, A. et al. Dureza e rugosidade superficial de cimentos de ionômero de vidro após ensaio de escovação. **Jornal of the Health Science Institute**, v. 31, n. 3, p. 244–247, 2013.
- MARINA, L. et al. Susceptibilidad a la nistatina de aislamientos bucales de *Candida* y su correlación con la respuesta al tratamiento. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 62, n. 3, p. 237–244, 2010.
- MARTI, L. M. et al. Effect of chlorhexidine gluconate on porosity and compressive strength of a glass ionomer cement. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, n. 4, p. 236–240, 2014.
- MARTÍNEZ, B. Y. ET AL. Use of antifungal agents for oral candidiasis : results of a national survey. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 8, p. 47–53, 2010.
- MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251–264, 2013.
- MEZZARI, M. et al. Prevalence of *Candida* spp . in the dental biofilm of fixed orthodontic appliances users. **Revsita da Faculdade de Odontologia de Porto**

Alegre, v. 53, n. 2, p. 5–10, 2012.

NICHOLSON, J. W. Chemistry of glass-ionomer cements: A review. **Biomaterials**, v. 19, n. 6, p. 485–494, 1998.

NICKERSON, K. W.; ATKIN, A. L.; HORNBY, J. M. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3805–3813, 2006.

NIIMI, M.; FIRTH, N. A.; CANNON, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** p. 15–25, 2010.

PARADELLA, T. Cimentos de ionômero de vidro na odontologia moderna. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 33, n. 4, p. 157–16, 2004.

PASQUALOTTO, A. C.; THIELE, K. O.; GOLDANI, L. Z. Novel triazole antifungal drugs: focus on isavuconazole, ravuconazole and albaconazole. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 11, n. 2, p. 165–74, 2010.

PIRES, H. C. Vickers hardness of 29 composite resins. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 28, n. 3, p. 16–23, 2007.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

RATSON, T. et al. Salivary *Candida*, caries and *Candida* in toothbrushes. **Dental Abstracts**, v. 54, n. 4, p. 219–220, 2009.

REGINATO, C. F. et al. Antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against *Candida dubliniensis* before and after in vitro fluconazole exposure. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 75–79, 2017.

REYNOLDS, T. B.; FINK, G. R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. **Science**, v. 291, n. 2, p. 878–882, 2001.

RIBAS, A. D. et al. Imidazolium salts with antifungal potential for the control of head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 445–452, 2016.

ROCHA, L. et al. Citotoxicidade de cimentos de ionômero de vidro restauradores sobre células de linhagem odontoblástica. **Cell**, 2006.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. SUPPL. 1, p. 7–11, 2006.

ROSÁRIO, L. et al. Prevalência e extensão da cárie dentária radicular em adultos e idosos brasileiros Root caries prevalence and severity in Brazilian adults and elderly. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. Supl 3, p. 59–68, 2013.

SALIM, N. et al. Chlorhexidine-impregnated PEM/THFM polymer exhibits superior activity to fluconazole-impregnated polymer against *Candida albicans* biofilm

- formation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 2, p. 193–196, 2013.
- SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. et al. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 10, p. 1318–1326, 2013.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2–13, 2015.
- SANTANA, D. P. et al. Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 83–90, 2012.
- SANTOS, V. A. DOS et al. Antifungal effect of electrospun nanofibers containing cetylpyridinium chloride against *Candida albicans*. **Brazilian oral research**, v. 28, n. 1, p. 1–6, 2014.
- SCHREKKER, C. M. L. et al. Multitask imidazolium salt additives for innovative poly(L-lactide) biomaterials: morphology control, *Candida* spp. biofilm inhibition, human mesenchymal stem cell biocompatibility, and skin tolerance. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 33, p. 21163–21176, 2016.
- SCHREKKER, H. S. et al. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. **Medicinal Chemical Communications**, v. 4, n. 11, p. 1457, 2013.
- SHARMA, M.; PRASAD, R. The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4834–4843, 2011.
- SIDHU, S.; NICHOLSON, J. A review of glass-ionomer cements for clinical dentistry. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 7, n. 3, p. 16, 2016.
- SILVA-DIAS, A. et al. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, 2015.
- SILVA, R. M. et al. Dental glass ionomer cement reinforced by cellulose microfibers and cellulose nanocrystals. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 389–395, 2016.
- SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241–247, 2011.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.
- SILVA, R. J. DA et al. Propriedades dos cimentos de ionômero de vidro : uma revisão sistemática. **Odontologia Clínica e Científica**, v. 9, n. 2, p. 125–129, 2010.

SIMMONS, J. O. et al. Effect of surface treatments on the mechanical properties and antimicrobial activity of desiccated glass ionomers. **Dental Materials**, v. 32, n. 11, p. 1343–1351, 2016.

SMITH, D. C. Development of glass-ionomer cement systems. **Biomaterials**, v. 19, n. 6, p. 467–478, 1998.

SPOLIDORIO, L. C. ET AL. The frequency of *Candida sp.* in biopsies of oral mucosal lesions. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 89–93, 2003.

STATE, S. P.; RIHS, L. B. Prevalência de cárie radicular em adultos e idosos na região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil Dental root surface caries prevalence among adults and senior citizens in southeast. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 311–316, 2005.

TE BRAKE, L. H. M. et al. Inhibitory potential of tuberculosis drugs on ATP-binding cassette drug transporters. **Tuberculosis**, v. 96, n. 6, p. 150–157, 2016.

TOPALOGLU-AK, A. et al. Effect of orthodontic appliances on oral microbiota--6 month follow-up. **The Journal of clinical pediatric dentistry**, v. 35, n. 4, p. 433–6, 2011.

TÜZÜNER, T.; ULUSU, T. Effect of antibacterial agents on the surface hardness of a conventional glass-ionomer cement. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 1, p. 45–49, 2012.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

WANDERLEY, F. et al. Utilização do ionômero de vidro em odontopediatria Glass ionomer cement in pediatric dentistry. v. 10, n. 1, p. 13–17, 2011.

XU, X.; BURGESS, J. O. Compressive strength, fluoride release and recharge of fluoride-releasing materials. **Biomaterials**, v. 24, n. 14, p. 2451–2461, 2003.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n. 1, p. 95–105, 2014.

YEH, C. K. et al. A population-based study of salivary lysozyme concentrations and candidal counts. **Archives of Oral Biology**, v. 42, n. 1, p. 25–31, 1997.