

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DO NITRATO DE
CÉRIO NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
PROPRIEDADES FÍSICO-MECÂNICAS DE
RESINAS ACRÍLICAS TERMOPOLIMERIZADAS**

Isabelle Cristine de Melo Freire

SAPIENTIA AEDIFICAT

2017

Isabelle Cristine de Melo Freire

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DO NITRATO DE CÉRIO NA
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E PROPRIEDADES FÍSICO-
MECÂNICAS DE RESINAS ACRÍLICAS TERMOPOLIMERIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista

João Pessoa

2017

F866e Freire, Isabelle Cristine de Melo.

Efeito da incorporação do nitrato de cério na atividade antifúngica e propriedades físico-mecânicas de resinas acrílicas termopolimerizadas / Isabelle Cristine de Melo Freire. -- João Pessoa: [s.n.], 2017.

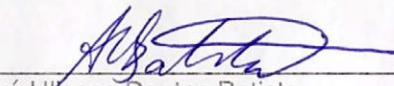
85f. : il.

Orientador: André Ulisses Dantas Batista

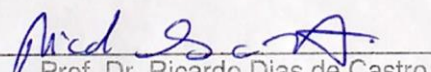
ISABELLE CRISTINE DE MELO FREIRE

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DO NITRATO DE CÉRIO NA
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E PROPRIEDADES FÍSICO-
MECÂNICAS DE RESINAS ACRÍLICAS TERMOPOLIMERIZADAS

Banca Examinadora



Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista
Orientador



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Examinador - UFPB



Prof. Dr. José Renato Cavalcanti de Queiroz
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

À Deus , por sua infinita bondade e misericórdia.

À Virgem Maria, pelo amor e intercessão.

Aos meus pais, por serem meu porto seguro,

mínha fonte de amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ser meu refúgio e proteção. Pelas vezes que segurou em minhas mãos quando me senti fraca, e me fez erguer a cabeça para seguir o caminho. Por sua infinita bondade e misericórdia. Por me proporcionar vitórias diárias. Palavras não são suficientes para expressar o meu Amor! A Ti toda honra, glória e louvor!

À Virgem Maria, Mãe da Ternura, singela flor de Deus e minha Mãe! Que é meu exemplo de mulher e santidade. Obrigada por me levar sempre para perto de Deus, pelo amor, pela intercessão e por me ensinar a ser melhor a cada dia, mesmo diante da minha pequenez.

Aos meus pais, João Batista e Soraya Cristina, que nunca mediram esforços para me proporcionarem sempre o melhor. Obrigada pelo amor, carinho, dedicação, paciência, zelo e por abdicarem de tantos momentos para me verem feliz. Obrigada por sonharem comigo e caminharem até aqui. O incentivo e apoio de vocês são fundamentais para todas as decisões em minha vida. Obrigada por ser essa base que tanto necessito e tanto me espelha. Amo vocês!

Aos meus irmãos Anne Carolline e Walber, e aos meus sobrinhos Juan Gabriel e Joaquim Henrique, que trazem tanta alegria ao nosso lar. Obrigada pelo amor e companheirismo de vocês.

Ao meu noivo Jonathan César, pelo amor, apoio, paciência, força e ânimo que me deu durante todos esses anos. Obrigada por me incentivar a lutar pelos meus sonhos. Obrigada pela compreensão e por abdicar de tantos momentos para que eu pudesse alcançar esta conquista. Te amo!

Ao meu orientador Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista, que é mais que um orientador, é um amigo! Obrigada por ter me ensinado a correr atrás dos meus sonhos e mostrar que somos capazes de conquistar aquilo que almejamos. Obrigada pela confiança depositada em mim e por toda dedicação, empenho e paciência durante estes anos de orientação! És um exemplo de mestre e humano. Sinto-me imensamente honrada por ter sido sua orientada.

Às minhas amigas Vanessa Feitosa, Rebeca Dantas e Cintia Gouveia, que me acompanham desde a graduação. Obrigada pelos momentos compartilhados, pelo apoio, força e incentivo que recebi durante estes 7 anos. Obrigada por chorarem comigo e por rirem ainda mais! A amizade de vocês é fundamental para mim.

Aos meus amigos, Mariana, Samuel, Camilla, Pedro, Ana Emília, Silvío, Júnior, Ysabelle, Rafaela, Francisco e Amanda, por tanto carinho e amor compartilhado. Obrigada por acreditarem em mim, por apoiarem cada passo dado em minha vida e por vibrarem a cada vitória. Obrigada, em especial, pelas orações de cada um de vocês.

A todos os meus familiares, por torcerem e acreditarem em mim.

Aos colegas de turma, que tornaram a caminhada mais fácil durante esses dois anos. Obrigada pelo companheirismo, pelos momentos de risadas e discussões que foram essenciais para chegarmos até aqui.

Aos amigos e companheiros de laboratório, que permitiram dias e noites mais leves, mesmo diante de tantos trabalhos.

À Rebeca Tibau, Roberta Bonan e Panmella Maciel pelo conhecimento compartilhado e auxílio na execução desta pesquisa.

Aos Profs. Drs. Lúcio Castellano, Elíton Medeiros e Ricardo Castro pelo auxílio teórico fornecido.

Ao Prof. Dr. Sandro Mardem e ao técnico Meyson por disponibilizar o Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao Prof. Domicio Rosendo pela gentileza em disponibilizar o Vita Easy Shade.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Ana Karina e Rosângela pela amizade e por disponibilizar o Microdurômetro.

Aos professores avaliadores, pelas sugestões e críticas que engrandeceram este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba pela paciência, companheirismo, ensinamentos e experiências compartilhadas. Obrigada por acreditarem em nós!

À empresa VIPPI, pelo fornecimento dos materiais utilizados nesta pesquisa.

EPÍGRAFE

“Depois de termos conseguido subir a uma grande montanha, só descobrimos que existem ainda mais grandes montanhas para subir.”

(Nelson Mandela)

RESUMO

Objetivos: Avaliar a atividade antifúngica de soluções de nitrato de cério, as propriedades físico-morfológicas [microscopia eletrônica de varredura (MEV), rugosidade superficial (S_a e S_z), ângulo de contato (θ) e parâmetros de cor ($L^*a^*b^*$)] e propriedade mecânica (dureza Vickers) de uma resina acrílica termopolimerizada incorporada com essas soluções. **Materiais e métodos:** Soluções de nitrato de cério hexidratado ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$) foram obtidas em dois tipos de solventes (DMSO 10% e DMSO 5% + Tween 80 5%). Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM) pelo ensaio de microdiluição e inibição de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 90028) em placa ($n=5$) e em corpos-de-prova ($n=10$). Para avaliação das propriedades físico-mecânicas, confeccionou-se corpos-de-prova cilíndricos (10 mm x 4 mm) em resina acrílica termicamente ativada por energia de micro-ondas, formando 5 grupos: sem modificação (grupo controle), incorporadas com 20% da solução 16xCIM e 32xCIM de DMSO+Cério (DC) e incorporadas com 20% da solução 16XCIM e 32xCIM de DMSO+Tween+Cério (DTC). Os espécimes foram submetidos à avaliação em MEV ($n=1$), ao ensaio de rugosidade superficial (S_a e S_z) por meio de perfilometria óptica ($n=20$), ensaio de ângulo de contato (θ) ($n=20$), ensaio de dureza Vickers ($n=20$) e determinação dos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) por espectrofotometria ($n=20$). Os dados foram analisados descritivamente e pelos testes Two-Way ANOVA (biofilme em placa) e ANOVA (rugosidade, dureza Vickers, parâmetros de cor e ângulo de contato) complementadas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$ para L^* e $\alpha=0,01$ para os demais) e a inibição da aderência fúngica nos corpos de prova foi analisada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney U ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Foi encontrada a CIM e CFM na concentração de 1625 $\mu\text{g/ml}$ para ambas as soluções testadas. Houve inibição do biofilme para todos os grupos e os grupos DC e DTC apresentaram valores de inibição superiores a 87% (24 horas) e 62% (48 horas), com diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (nistatina) em ambos os intervalos de tempo testados ($p<0,01$). Para a rugosidade encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle ($S_a=0,052$, $S_z=0,51$) e os demais grupos, sendo os valores mais elevados dos grupos DC 16xCIM ($S_a=0,224$, $S_z=2,34$) e

DC 32xCIM ($S_a=0,202$, $S_z=2,13$). Para a dureza, o grupo controle (19,91) e o DC 16xCIM (18,72) apresentou diferença dos demais grupos. No ângulo de contato, o grupo DC 16xCIM apresentou o maior ângulo de contato ($80,49^\circ$), sem diferença estatisticamente significativa do Controle ($77,16^\circ$); o grupo DC 32xCIM ($59,42^\circ$) apresentou o menor ângulo de contato. Na análise de cor, o grupo controle apresentou os menores parâmetros L^* , a^* e b^* , com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. **Considerações finais:** As soluções avaliadas apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans* tanto na forma planctônica quanto em biofilme assim como houve redução da aderência de biofilme à resina acrílica modificada por nitrato de cério nos grupos DC 16xCIM e DC 32xCIM. No entanto, estas resinas experimentais apresentaram alterações em todas as propriedades avaliadas, com maiores valores de rugosidade e parâmetros L^* , a^* e b^* de cor, e menores valores de dureza e ângulo de contato.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the antifungal activity of different cerium nitrate solutions, the physical-morphological properties by scanning electronic microscope (SEM), surface roughness (Sa and Sz), contact angle (θ) and color parameters ($L^*a^*b^*$) and the mechanical property (Vickers hardness) of a thermo polymerized acrylic resin incorporated with the solutions. **Materials and methods:** Cerium hexahydrate nitrate solutions ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$) were obtained in two types of solvents (a-10% DMSO and b-5% DMSO + 5% Tween 80). Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC) were determined the by micro dilution assay and inhibition of *Candida albicans* (ATCC 90028) biofilms was performed in plates (n = 5) and in test specimens (n = 10). To evaluate the physical and mechanical properties, cylindrical specimens were made (10 mm X 4 mm) with acrylic non-incorporated (control group), incorporated with 20% of 16xCIM and 32xCIM DMSO + Cerium (DC) solution and incorporated with 20% of 16XCIM and 32xCIM DMSO + Tween + Cerium (DTC) solution. Specimens were analyzed by optical profilometry surface roughness assay (Sa and Sz) (n = 20), contact angle test (θ) (n = 20), Vickers hardness test (n = 20) and determination of color parameters (L^* , a^* and b^*) by spectrophotometry (n = 20). Data were descriptively analyzed and the Two-Way ANOVA (plate biofilm) and ANOVA (roughness, Vickers hardness, color parameters and contact angle) complemented by Tukey test ($\alpha = 0.05$ for L^* and $\alpha=0,01$ for the others) and the inhibition of fungal adherence in the specimens was analyzed by the non-parametric Mann-Whitney U test ($\alpha = 0.05$). **Results:** CIM and CFM concentration was 1625 μ L/mL for both tested solutions. There was biofilms inhibition for all groups and DC and DTC groups showed inhibition values greater than 87% (24 hours) and 62% (48 hours), with statistically significant differences from the control group (Nystatin) in both ranges tested time ($p < 0.01$). For the roughness, a statistically significant difference was found between the Control group (Sa = 0.052, Sz = 0.51) and the other groups, with the highest values of the groups DC 16xCIM (Sa = 0.224, Sz = 2.34) and DC 32xCIM (Sa = 0.202, Sz = 2.13). For the hardness, the control group (19.91) and the DC 16xCIM (18.72) presented difference of the other groups. At the

contact angle, the DC 16xCIM group had the highest contact angle (80.49°), with no statistically significant difference from the control (77.16°); the DC 32xCIM group (59.42°) had the lowest contact angle. In the color analysis, the control group had the lowest L*, a* and b* parameters, with a statistically significant difference in relation to the other groups. **Final Considerations:** The evaluated solutions presented antifungal activity against *Candida albicans* in both planktonic and biofilm forms as well as reduction of biofilm adhesion to cerium nitrate modified acrylic resin in the DC 16xCIM and DC 32xCIM groups. However, these experimental resins presented alterations in all properties evaluated, with higher values of roughness and parameters * L a * and b * of color, and lower values of hardness and contact angle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetro
μl	Microlitro
μg	Micrograma
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
Au	Ouro
CeO_2	Óxido de cério
$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de cério hexahidratado
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Desvio-padrão
G	Gramas
IQ	Distância interquartil
L	Litro
LABIMIC	Laboratório de Microbiologia
LABIO	Laboratório Integrado de Biomateriais
LACEC	Laboratório de Cultivo Celular
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
PBS	Tampão fosfato-salino
PMMA	Poli(metil metacrilato)
RPM	Rotações por minuto
Sa	Rugosidade aritmética média (superfície)
Sz	Rugosidade máxima em altura (superfície)
TCT	2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UI	Unidades Internacionais
θ	Ângulo de contato

SUMÁRIO

1 Introdução	15
2 Revisão da literatura	18
2.1 Estomatite protética	18
2.2 Poli(metil metacrilato) – PMMA	20
2.3 Nitrato de cério	24
3 Proposição	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 Material e métodos	30
4.1 Materiais	30
4.2 Métodos	37
4.2.1 Grupos amostrais	37
4.2.2 Local da pesquisa	39
4.2.3 Ensaio microbiológico	39
4.2.3.1 Preparo das soluções químicas	39
4.2.3.2 Preparo das cepas de <i>Candida albicans</i>	40
4.2.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	40
4.2.3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	42
4.2.3.5 Efeito da solução de Nitrato de Cério na redução do biofilme maduro de <i>C. albicans</i>	43
4.3 Confeção dos corpos-de-prova	45
4.3.1 Confeção dos corpos-de-prova de resina acrílica incorporadas com solução de nitrato de cério	45
4.3.2 Ensaio microbiológico de inibição de aderência fúngica à resina acrílica termopolimerizável	51
4.3.3 Caracterização físico-morfológica e ensaio mecânico	51
4.3.3.1 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
4.3.3.2 Análise rugosimétrica (Sa e Sz)	52
4.3.3.3 Análise da Dureza Vickers	53
4.3.3.4 Análise do ângulo de contato	53
4.3.3.5 Análise dos parâmetros de cor	54
4.4 Análise estatística	56
5. Resultados	57
5.1 Determinação da CIM e CFM	57
5.2 Efeito da solução de Nitrato de Cério na redução do biofilme maduro de <i>C. albicans</i>	58

5.3 Inibição da aderência fúngica aos espécimes de resina acrílica termopolimerizável	60
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
5.5 Rugosimetria	63
5.6 Dureza Vickers	66
5.7 Análise do ângulo de contato	66
5.8 Análise dos parâmetros de cor	67
6. Discussão	68
7. Considerações finais	77
Referências Bibliográficas	78

1. INTRODUÇÃO

Os dados epidemiológicos do Brasil demonstram que o edentulismo parcial e total é um problema de saúde pública que acomete uma parcela significativa da população brasileira. Observou-se que 13,7% dos indivíduos examinados na faixa etária de 15 a 19 anos necessitam de prótese, a qual evolui para 68,8% na faixa etária de 35 a 44 anos e aumenta para 92,3% na faixa etária entre 65 a 74 anos, confirmando que somos um país com uma população extremamente necessitada de tratamento protético (SB BRASIL 2010).

As próteses totais e parciais confeccionadas com resina acrílica são os meios de tratamento mais acessíveis para a maioria da população, tanto pelo seu baixo custo como pela sua versatilidade de aplicações. O material mais utilizado para a sua confecção é o poli(metil metacrilato) (PMMA), o qual apresenta propriedades físicas, mecânicas e estéticas aceitáveis. No entanto, seu processamento laboratorial é susceptível a falhas nos procedimentos técnicos de inclusão, prensagem, polimerização, acabamento e polimento, que podem levar à formação de poros e trincas em sua estrutura. Desta forma, a principal desvantagem da prótese confeccionada em PMMA é a sua susceptibilidade para a colonização por *Candida albicans* e outros agentes patogênicos que podem conduzir a uma estomatite protética, caracterizada por ser uma condição complexa com uma etiologia multifatorial (DHIR et al., 2007; KARAAGACLIOGLU et al., 2008; NAM, 2014; RAJ; DENTINO, 2013; SIVAKUMAR et al., 2014).

A estomatite protética ocorre em mais de 65% dos usuários de prótese total, sendo a forma mais frequente de candidose oral. As superfícies das próteses apresentam-se como um reservatório para esses agentes infecciosos e, portanto, desenvolvem-se áreas eritematosas na mucosa do palato revestida pela prótese dentária (SALERNO et al., 2011; WILLIAMS; LEWIS, 2011). Alguns fatores que predisõem o desenvolvimento da estomatite protética são: deficiência da higiene oral, redução do fluxo salivar, traumas, diabetes, uso de esteroides em longo prazo e rugosidade e microporos na superfície da resina acrílica (PARANHOS et al., 2007).

O fungo do gênero *Candida* contém mais de 150 espécies, muitas das quais são comensais e podem estar presentes na cavidade oral dos indivíduos saudáveis. Quando o sistema de defesa do hospedeiro sofre alguma alteração, como a imunodeficiência, esses comensais podem provocar um estado patogênico, a candidose, que pode envolver diversas espécies como *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*. No entanto, a espécie mais encontrada nesta patologia é a *C. albicans*. A candidose pode manifestar-se através de vários aspectos clínicos, desde o acometimento de sítios na cavidade oral até formas mais invasivas. Este processo infeccioso é bastante comum em indivíduos usuários de próteses (CAVALCANTI et al., 2015; SALERNO et al., 2011; WILLIAMS; LEWIS, 2011).

A patogenicidade destes micro-organismos está diretamente relacionada com a capacidade de formação de biofilmes, que são comunidades microbianas bem estruturadas, nas quais as células fúngicas são incorporadas em uma matriz extracelular. Suas células possuem alto potencial de aderência à superfície de materiais artificiais, como as próteses dentárias, e também aos tecidos orais. Quando estes biofilmes apresentam alta resistência à terapia antimicrobiana convencional e às defesas do hospedeiro, podem evoluir e resultar em infecções persistentes (SILVA-DIAS et al., 2015).

Existem diversos tratamentos para a referida patologia, como o uso de soluções químicas desinfetantes, antifúngicos, antibióticos, terapias com laser e confecção de novas próteses. No entanto, o amplo uso dos antifúngicos e antibióticos, pode levar a uma resistência microbiana, promovendo o fracasso nas terapias convencionais (NAM, 2014; PARANHOS et al., 2007; YARBOROUGH et al., 2016).

Apesar dos tratamentos voltados ao combate destas infecções, a exemplo da utilização de substâncias antifúngicas e soluções químicas, nenhum deles apresenta-se ideal. Este fato impulsiona o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e substâncias antimicrobianas. Desta forma, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de melhorar as características mecânicas, físicas e antimicrobianas das resinas acrílicas

utilizadas para base de prótese, a fim de alcançar um material ideal (LI et al., 2016; NAM, 2014; WADY et al., 2012; YU et al., 2014). Tentativas foram feitas para combinar substâncias antifúngicas com o PMMA a exemplo da incorporação de nanopartículas de platina (NAM, 2014), nanopartículas de prata (EL-AASSAR et al., 2013; KONG; JANG, 2008; LYUTAKOV et al., 2015; MONTEIRO et al., 2012; WADY et al., 2012), nanoestruturas de vanadato (DE CASTRO et al., 2014), e outras.

Entre as substâncias recentemente avaliadas contra *Candida* spp. encontra-se o cério (Ce), pertencente ao grupo dos lantanídeos ou “terras raras” e possui diversos efeitos biológicos, porém, suas propriedades farmacológicas ainda não foram totalmente exploradas (COBRADO et al., 2012; SILVA-DIAS et al., 2015). O óxido de cério (CeO_2) é um importante material estudado recentemente por apresentar diversas aplicações científicas e tecnológicas, importante para o progresso da nanotecnologia devido às suas propriedades eletrônicas, magnéticas, catalíticas e microbiológicas desejáveis. A atividade antimicrobiana das nanopartículas de óxido de cério ocorre devido à sua natureza redox, a qual auxilia na inibição do crescimento de bactérias e na eliminação de radicais livres (KEYSON et al., 2008; SURESH BABU et al., 2014). Estudos mostram que o nitrato de cério [$Ce(NO_3)_3$] tem sido utilizado no tratamento de queimaduras e seu efeito bacteriostático ou bactericida foi relatado por alguns autores (AUJOULAT et al., 2011; JAKUPEC; UNFRIED; KEEPLER, 2005). Além disso, o nitrato de cério apresenta efeito antifúngico, principalmente contra *C. albicans*, tanto na forma planctônica quanto na forma de biofilme (COBRADO et al., 2012; SILVA-DIAS et al., 2015).

Embora promissora, não encontrou-se na literatura estudos que tenham utilizado esses materiais associadas a resinas acrílicas de base de prótese. No entanto, devido suas propriedades e atividade antimicrobiana, associada à necessidade do desenvolvimento de novos materiais eficientes contra patologias fúngicas, propõe-se avaliar a atividade antifúngica de soluções de $Ce(NO_3)_3$ e as propriedades físico-mecânicas de uma resina acrílica termopolimerizada incorporada com essas soluções, procurando-se, dessa forma, contribuir no estudo de alternativas de tratamento para infecções por *Candida* na cavidade bucal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estomatite protética

Com o aumento da expectativa de vida e envelhecimento da população, há uma alta prevalência do edentulismo parcial e total e, conseqüentemente, maior número de usuários de próteses dentárias (GANTAIT et al., 2016). Williams e Lewis (2011) afirmam que a estomatite protética ocorre em cerca de 65% dos usuários de prótese total. Outros autores relatam que a estomatite pode afetar mais de 70% dos usuários de próteses (GENDREAU; LOEWY, 2011).

A etiologia da estomatite é multifatorial, no entanto, há evidências de sua associação com traumatismos na mucosa devido ao desajuste da dentadura, má higienização, tempo de uso das próteses, além da susceptibilidade das próteses dentárias à contaminação microbiana, decorrente da presença de microporos, trincas e irregularidades, tornando o ambiente propício para o desenvolvimento de fungos e bactérias (GANTAIT et al., 2016; GENDREAU; LOEWY, 2011).

A estomatite protética é uma infecção fúngica que caracteriza-se, frequentemente, como uma inflamação eritematosa, principalmente na mucosa do palato recoberta pela superfície protética. Apesar da alta prevalência, a estomatite é frequentemente assintomática; apenas a minoria dos indivíduos relata alguns dos seus sintomas como dor, hiperplasia, prurido ou ardor, além de provocar um impacto negativo na qualidade de vida das pessoas afetadas (YANO et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

A candidose é uma das mais comuns infecções fúngicas da cavidade oral, a qual pode ser fonte frequente de desconforto, dor, perda do paladar e aversão à comida. Esta apresenta-se como uma infecção oportunista e superficial, tendo como principal agente etiológico a *Candida albicans*. No entanto, pode envolver diversas outras espécies como *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Algumas mudanças na cavidade oral podem predispor a candidose, como antibióticos,

corticosteróides, xerostomia, diabetes mellitus, deficiências nutricionais e doenças imunossupressoras (DANGI; SONI; NAMDEO, 2010).

Diversas espécies de *Candida* fazem parte da microbiota humana saudável e, portanto, são frequentemente encontradas em implantes, cateteres, próteses e em diversos outros biomateriais utilizados pelos indivíduos. Os micro-organismos se organizam de forma a constituir os biofilmes, que são comunidades microbianas bem estruturadas, nas quais as células fúngicas são incorporadas em uma matriz extracelular (SARDI et al., 2013; WILLIAMS; LEWIS, 2011; YANO et al., 2016).

A formação do biofilme está diretamente relacionada à patogenicidade destes micro-organismos. Eles conseguem se aderir facilmente ao poli(metil metacrilato) e penetrar nas microfendas e fissuras presentes neste material. Tais micro-organismos podem apresentar-se na forma de leveduras, pseudo-hifas ou hifas, sendo as hifas de maior resistência e melhor capacidade de aderência às superfícies, o que permite sua invasão no tecido epitelial (WILLIAMS; LEWIS, 2011).

O desenvolvimento do biofilme ocorre em três fases distintas: inicial, intermediária e madura. Inicialmente, uma camada de leveduras adere-se à superfície do material; a fase intermediária é caracterizada pelo envolvimento de uma matriz extracelular, a qual, na fase madura, aumenta constantemente até que as comunidades de *C. albicans*, constituídas por leveduras, pseudo-hifas e hifas, encontrem-se totalmente recobertas pela matriz. Este biofilme apresenta uma estrutura complexa que envolve a distribuição das células fúngicas e da matriz extracelular, o que facilita o influxo de nutrientes e a eliminação dos resíduos microbianos (SOLL; DANIELS, 2016).

Para evitar o desenvolvimento desta patologia, é recomendado que os indivíduos realizem adequada higienização das próteses através de métodos químicos, mecânicos ou combinados. Portanto, fatores como a frequência e técnica de higienização e a motivação do paciente são essenciais para sucesso e longevidade da prótese dentária (NAM, 2014; PARANHOS et al., 2007). Existem também diversas estratégias para o tratamento de pacientes com estomatite protética: terapia antifúngica, incluindo administração sistêmica e aplicação tópica, uso de soluções desinfetantes, tratamento da região afetada

com laser, melhorias na higiene oral, desinfecção por micro-ondas e a confecção de novas próteses. Destes, os tratamentos mais comuns na população são as terapias antifúngicas, com ampla variedade de substâncias, e o uso de soluções químicas (YARBOROUGH et al., 2016).

Apesar da eficácia dos desinfetantes químicos tradicionais das próteses dentárias, seu uso inadequado pode ser prejudicial para os tecidos orais. Ocasionalmente, a própria limpeza da dentadura pode ser comprometida para alguns pacientes com idade mais avançada ou hospitalizados devido às condições de saúde mental ou física. Uma alternativa para estes pacientes é a utilização de antifúngicos sistêmicos ou locais a fim de reduzir a população de micro-organismos (NAM, 2014; PARANHOS et al., 2007). Porém, frequentemente nos deparamos com o fracasso terapêutico, o que acontece, muitas vezes, porque antifúngicos clássicos não são totalmente eficazes no combate ao biofilme de *Candida* e o amplo uso de antimicrobianos pelos indivíduos promove o desenvolvimento da resistência microbiana. Esta resistência influencia negativamente no tratamento e prevenção de doenças infecciosas da cavidade oral (LYUTAKOV et al., 2015; SILVA-DIAS et al., 2015).

Dentre as substâncias presentes no mercado voltadas ao combate destas infecções, nenhuma delas apresenta-se ideal, visto que alguns mecanismos patogênicos relacionados com infecções por *Candida ssp.* ainda não são bem estabelecidos (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). Portanto, faz-se necessário a busca de novas alternativas para o tratamento de infecções por *Candida* na cavidade oral.

2.2 Poli(metil metacrilato) - PMMA

Com a descoberta da borracha vulcanizada por Charles Goodyear em 1840, iniciou-se a utilização dos polímeros na construção de próteses dentárias. Após 15 anos, este material começou a ser introduzido na Odontologia com a denominação de vulcanite, sendo utilizado como bases de dentaduras e associados a dentes de porcelana. Este continuou a ser o principal material utilizado nas bases das próteses durante 75 anos, mesmo

possuindo pouca estética, mau cheiro e gosto desagradável (FERRACANE, 2001). Em 1937, Walter Wright desenvolveu o poli(metil metacrilato) (PMMA) e observou suas inúmeras vantagens, passando a utilizá-lo como material de base de próteses (CHOKSI; MODY, 2016).

A resina acrílica de poli(metil metacrilato) é, atualmente, o material mais utilizado para a fabricação das próteses totais, parciais removíveis, próteses totais sobre implantes e diversos tipos de aparelhos ortodônticos removíveis, visto que podem reproduzir a forma, tamanho e cor dos tecidos orais, o que proporciona resultados estéticos e funcionais satisfatórios. Também apresentam outras vantagens, tais como facilidade de manipulação, baixo custo, propriedades químicas e mecânicas adequadas e biocompatibilidade (GOIATO et al., 2016, 2014; HONG et al., 2009).

As resinas acrílicas utilizadas na Odontologia podem diferir quanto ao tipo de polimerização, as quais podem ser realizadas por ativação química, ativação de luz visível ou ativação térmica, seja por banho de água, calor seco ou energia de micro-ondas. No último método, as moléculas de monômero vibram ao serem expostas a um campo eletromagnético de alta frequência. Este fenômeno leva a colisões intermoleculares que geram o calor e realizam o processo de ativação. A ativação térmica por energia de micro-ondas tem sido cada vez mais utilizada devido à facilidade da técnica, relativo baixo custo laboratorial e rapidez de processamento (BOTEGA et al., 2004).

Ao longo dos anos, materiais alternativos para o PMMA foram introduzidos na odontologia. Vários tipos de fibras ou esferas foram adicionadas, às resinas acrílicas, como carbono, polietileno e fibras de vidro, na tentativa de melhorar suas propriedades físicas e mecânicas, visto que é comum a formação de poros e trincas em sua estrutura (KARAAGACLIOGLU et al., 2008). Pesquisas contemporâneas vêm sendo desenvolvidas na tentativa de melhorar as características mecânicas e antimicrobianas das resinas acrílicas utilizadas para base de prótese, a fim de alcançar um material ideal (LI et al., 2016; NAM, 2014; WADY et al., 2012; YU et al., 2014).

Substâncias biocidas foram incorporadas ao PMMA a fim de promover uma modificação em sua superfície, através de alterações em sua natureza hidrofóbica, na liberação dos elementos biocidas e inibição da aderência

microbiana. A presença de 15% de fosfato na base de próteses aumentou a hidrofília e reduziu significativamente a adesão de *C. albicans*. Quando modificado com 10% de ácido metacrílico, o PMMA também apresentou um decréscimo significativo na adesão de *Candida*. O metacrilato 2-terbutilaminoetilo (TBAEMA) é uma substância policatiônica que demonstrou atividade antimicrobiana significativa contra *S. aureus* e *S. mutans*, porém, nenhum efeito significativo sobre *C. albicans*. Outros materiais como zeólitos de prata, nanopartículas de prata e nanopartículas de titânio também demonstraram atividade antimicrobiana, quando associados ao PMMA (SIVAKUMAR et al., 2014).

Pesquisadores desenvolveram novos polímeros para próteses dentárias modificadas por ânions, as quais podem apresentar bons resultados antimicrobianos, no entanto, podem comprometer as propriedades físicas e mecânicas exigidas para uma prótese. A incorporação do ácido metacrílico ao PMMA nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20 e 25% foi eficaz contra a adesão de *C. albicans* à superfície do polímero. À medida que a proporção de ácido metacrílico aumentou, a área de superfície de *C. albicans* aderentes diminuiu, enquanto o PMMA sem modificações apresentou maior área de microorganismos aderentes. No entanto, as avaliações mecânicas mostraram que os PMMA modificados por ácido metacrílico têm a tendência de comprometer a resistência à flexão e o módulo de elasticidade quando o teor de ácido metacrílico no polímero foi maior que 10%. Os autores sugeriram que o PMMA modificado por 10% de ácido metacrílico poderia servir como resinas para próteses, a fim de prevenir a adesão de *C. albicans*, sem trazer grandes prejuízos para as propriedades mecânicas (RAJ; DENTINO, 2013).

Nam, Lee, Lee (2012) avaliaram o efeito de resinas acrílicas contendo nanopartículas de prata sobre a adesão e formação de biofilme de *C. albicans* e observaram que, em concentrações elevadas de prata, houve uma atividade anti-aderente significativa na superfície da resina acrílica. Outros autores também avaliaram a ação antimicrobiana das nanopartículas de prata e obtiveram resultados satisfatórios, o que sugere o desenvolvimento de novos estudos para verificar biocompatibilidade, parâmetro de cor e ensaios mecânicos para possível utilização clínica deste material (EL-AASSAR et al.,

2013; KONG; JANG, 2008; LYUTAKOV et al., 2015; MONTEIRO et al., 2012; WADY et al., 2012).

Além da ação antimicrobiana, estudos têm avaliado as propriedades mecânicas de PMMA modificados por partículas. Sodogar et al. (2012) avaliaram a resistência à flexão do PMMA modificado por nanopartículas de prata. Os resultados mostraram que a resina acrílica sem modificação apresentou maior resistência à flexão e que a adição de 0,05% de nanopartículas de prata, diminuiu significativamente a sua resistência à flexão (SODAGAR et al., 2012).

Kartika (2015) avaliaram o efeito da adição do agente antimicrobiano zeólito de prata sobre a porosidade de resina acrílica de base da prótese. Não foram encontradas diferenças significativas na porosidade média entre os grupos controle e incorporados com o agente antimicrobiano. Portanto, concluíram que a adição de zeólitos de prata não provoca um aumento significativo da porosidade e que esta pode ser uma opção viável para o processamento de próteses dentárias (KARTIKA, 2015).

Nanopartículas de óxido de titânio e óxido de sílica também foram incorporadas em resinas acrílicas a fim de avaliar a resistência à flexão deste produto. Os autores observaram que a incorporação de nanopartículas de TiO_2 e SiO_2 em resinas acrílicas podem afetar negativamente a resistência à flexão dos produtos finais, e que este efeito está diretamente correlacionado com a concentração de nanopartículas, visto que a resistência à flexão do grupo controle foi maior quando comparada com o grupo que continha 0,5% de TiO_2 e SiO_2 (SODAGAR et al., 2013).

De Castro et al. (2012) realizaram a incorporação de nanoestruturas de vanadato de prata em resinas acrílicas a fim de avaliarem sua atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, além de examinarem a dureza de superfície e resistência à compressão das resinas modificadas. Os espécimes foram divididos em seis grupos, sendo o grupo controle sem a adição de nanoestruturas, e os demais grupos formados pela incorporação de 0,5%, 1%, 2,5%, 5% e 10% de nanoestruturas de vanadato de prata. Eles observaram que o grupo com 10% de vanadato de prata obteve atividade

antimicrobiana contra todas as cepas, no entanto, a concentração inibitória mínima variou entre os micro-organismos, sendo: 1% para o *P. aeruginosa*, 2,5% para o *S. aureus*, 5% para *C. albicans* e 10% para o *S. mutans*. Quanto às propriedades mecânicas, a dureza superficial e a resistência à compressão aumentaram significativamente com a adição de 0,5% de vanadato de prata, no entanto, valores mais elevados de incorporação não provocaram diferenças em relação ao grupo controle (DE CASTRO et al., 2014).

Al-Dwairi et al. (2012) avaliaram a rugosidade superficial, ângulo de contato e dureza do poli(metil metacrilato) antes e após a exposição às soluções (nistatina, fluconazol e água destilada) e sua relação com a adesão *in vitro* de *Candida albicans*. Os resultados mostraram que a nistatina não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a dureza, mas teve efeito sobre a rugosidade superficial, ângulo de contato e adesão de *Candida* ao PMMA. Por outro lado, o fluconazol não apresentou efeito estatisticamente significativo na dureza e rugosidade superficial, mas teve efeito no ângulo de contato e na adesão de *Candida* ao PMMA. A água destilada não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre nenhuma das propriedades.

Foggi et al. (2014) avaliaram o efeito da rugosidade superficial sobre a hidrofobicidade de resinas acrílicas, assim como a adesão e formação de biofilmes de *C. albicans*. Foram avaliados seis grupos experimentais, com diferentes valores de rugosidade superficial (R_a): 0,05, 0,2, 0,4, 0,8, 1,5 e 3,0. Os resultados apresentaram que a rugosidade aumentou significativamente a hidrofobicidade. Desta forma, o menor valor de rugosidade (0,05 μm) apresentou também o menor valor do ângulo de contato (75°). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa para adesão inicial e formação de biofilme sobre as superfícies das resinas entre todos os grupos.

2.3 Nitrato de Cério

O cério (Ce) é o elemento mais abundante na crosta terrestre da série dos lantanídeos, conhecido como terras raras e tem chamado a atenção dos pesquisadores devido às suas propriedades e aos diversos efeitos biológicos (SILVA-DIAS et al., 2015). Alguns estudos mostram a eficácia do cério no

tratamento de queimaduras, o que ocorre devido a sua atividade imunomoduladora (AUJOULAT et al., 2011; JAKUPEC; UNFRIED; KEEPLER, 2005).

Suas propriedades antimicrobianas ainda não são totalmente conhecidas, mas acredita-se que o cério é absorvido pelo citoplasma, provoca inibição da respiração celular e rompimento da membrana celular. Estudos mostraram o efeito microbicida do nitrato de cério $[Ce(NO_3)_3]$ contra bactérias e leveduras, o qual, mesmo em concentrações mais baixas, apresentou-se eficaz contra biofilme de *C. albicans* (COBRADO et al., 2012, 2013; SILVA-DIAS et al., 2015).

Além da atividade antimicrobiana, o cério possui diversas outras vantagens: é um elemento químico abundante na natureza, o que o torna facilmente disponível e menos caro quando comparado a outras alternativas; não é tóxico, uma vez que não pode atravessar as membranas celulares de mamíferos e é utilizado na prática clínica para o tratamento de queimaduras; e não induz resistência em *Candida*, problema frequentemente encontrado em algumas substâncias antifúngicas (SILVA-DIAS et al., 2015).

O nitrato de cério $[Ce(NO_3)_3]$ é amplamente utilizado como material precursor para síntese de nanopartículas e nanofibras de óxido de cério (FARIAS et al., 2015; LIU; HON; TEOH, 2013), as quais têm sido estudadas devido sua ação como agentes antimicrobianos (NAM, 2014), e também pela vantagem de apresentarem alta área superficial, tendo grande potencial como estruturas para liberação de fármacos e de reforço estrutural (FARIAS et al., 2015; RAMESHBABU et al., 2015).

Estudos testaram a ação antimicrobiana de nanopartículas de óxido de cério (CeO_2) e nanopartículas de óxido de cério associadas ao ouro (Au/CeO_2) e sua citotoxicidade para macrófagos normais e células cancerosas do pulmão. Os resultados demonstraram melhor seletividade de nanopartículas de Au/CeO_2 para as células cancerosas de uma maneira dependente da concentração de nanopartículas de CeO_2 . Essas nanopartículas de Au/CeO_2 mostraram boa biocompatibilidade com células de macrófagos normais, mas inibiu o crescimento de células epiteliais de adenocarcinoma. Além disso, a atividade antibacteriana destas nanopartículas foi eficaz contra várias espécies

tais como *E. coli*, *S. enteritidis*, *B. subtilis*, *S. aureus* e sugeriram que, em comparação com o ouro puro, a associação de Au/CeO₂ exibiu um melhor efeito antibacteriano (SURESH BABU et al., 2014).

Poucos estudos avaliaram as propriedades antifúngicas do nitrato de cério contra as diversas espécies de *Candida* e sua capacidade de interferir *in vitro* e *in vivo* na formação de biofilme.

Cobrado et al., (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana do nitrato de cério, da quitosana e do hamamelitanino contra cepas microbianas normalmente envolvidas nas infecções da corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateteres. Avaliaram também a sua eficácia em relação à formação de biofilme em cateteres de poliuretano. O efeito antimicrobiano foi testado contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Candida albicans*. A formação do biofilme foi avaliada utilizando segmentos de cateter e a atividade metabólica foi quantificada por colorimetria com um ensaio de redução de tetrazólio. Os resultados mostraram que o nitrato de cério e a quitosana inibiram o crescimento microbiano de todas as espécies testadas, no entanto, o hamamelitanino não mostrou inibição. Quanto à formação de biofilmes em cateteres de poliuretano, o nitrato de cério inibiu significativamente a atividade metabólica de *C. albicans*; a quitosana reduziu a atividade metabólica de *S. epidermidis* e *C. albicans*, e o hamamelitanino diminuiu a atividade metabólica de todas as bactérias testadas, porém não diminuiu da *C. albicans*. Concluíram que a atividade microbicida do nitrato de cério e da quitosana foi claramente demonstrada neste estudo, assim como seu efeito fungistático em concentrações mais baixas. O hamamelitanino reduziu significativamente a atividade metabólica do biofilme de todas as bactérias testadas. Portanto, estes inibidores microbianos podem desempenhar um papel promissor para diferentes aplicações biomédicas.

Cobrado et al., (2013) determinaram a atividade *in vivo* das soluções de nitrato de cério, quitosana e hamamelitanino, contra patógenos associados à infecções da corrente sanguínea relacionadas com cateter, como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Candida albicans*. Através da implantação de segmentos de cateter de poliuretano em ratos, avaliaram a atividade metabólica e a redução de biofilme

nestes segmentos. Os resultados mostraram que o nitrato de cério reduziu significativamente a formação de biofilme de *C. albicans* e a quitosana diminuiu significativamente a formação de biofilme por *S. epidermidis* e *C. albicans*. No entanto, o hamamelitanino reduziu o biofilme bacteriano, mas não obteve sucesso contra *C. albicans*.

Silva-Dias et al., 2015 avaliaram a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima das soluções de nitrato de cério e iodeto de propídeo, realizaram ensaio de cinética fúngica, inibição e susceptibilidade do biofilme. *In vivo*, avaliaram a eficácia do nitrato de cério como um revestimento para dispositivos médicos (cateter de poliuretano) contra *Candida parapsilosis*. Os resultados mostraram que o crescimento de todas as espécies de *Candida* foi inibido com a solução de nitrato de cério, no entanto, as doses letais (CFM) foram acima das concentrações inibitórias mínimas. No ensaio da cinética fúngica, observaram que a solução testada foi eficaz após 3 horas de exposição, o que resultou na diminuição da viabilidade em 90%. Para o teste de biofilme, observou-se que a solução foi capaz de reduzir significativamente a adesão de todas as espécies de *Candida* testadas, com exceção da *C. albicans* e *C. krusei*. Nos resultados *in vivo*, observaram que os segmentos do cateter de poliuretano embebidos com solução de nitrato de cério exibiram um decréscimo significativo na atividade metabólica do biofilme de *C. parapsilosis*. Através da Microscopia Eletrônica de Varredura, os autores observaram que a arquitetura do biofilme tratado com o nitrato de cério apresentava-se diferente do grupo sem tratamento. Além da diminuição da biomassa do biofilme, a solução provocou alterações morfológicas: as leveduras eram menores, exibiu uma superfície irregular, algumas células foram colapsadas e outras células foram esvaziadas do seu conteúdo. Além disso, as leveduras foram rodeadas por uma película composta de cério, carbono, oxigênio, fósforo e cálcio, conforme determinado por análise de raios-X. Concluíram, portanto, que o nitrato de cério pode ser utilizado na prática clínica, visto sua eficácia na prevenção da formação de biofilme, além de ser utilizado como uma terapia antifúngica (SILVA-DIAS et al., 2015).

Devido à elevada prevalência da estomatite protética associada a frequente resistência microbiana, a ineficácia, alto custo e agressividade ao organismo de alguns agentes antimicrobianos convencionais, surgiu o interesse de desenvolver materiais eficientes no combate a infecções fúngicas. Desta forma, o presente estudo propõe avaliar formas de tratamento alternativas para infecções por *Candida* na cavidade oral, visto que o nitrato de cério não é tóxico, possui ação antifúngica e é um elemento químico abundante na natureza.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica do nitrato de cério [Ce(NO₃)₃] e as propriedades físico-mecânicas de uma resina acrílica termopolimerizada por energia de micro-ondas incorporada com diferentes soluções de nitrato de cério.

3.2 Objetivos específicos




- Avaliar a atividade antifúngica da solução de nitrato de cério sobre cepas de *Candida albicans*, através dos ensaios de microdiluição e redução de biofilme maduro em placa.
- Avaliar a redução da aderência de biofilme de *Candida albicans* em uma resina acrílica termopolimerizada incorporada por nitrato de cério e uma resina comercial (controle).
- Avaliar a topografia superficial por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma resina acrílica termopolimerizada incorporada por nitrato de cério e uma resina comercial (controle).
- Avaliar a rugosidade superficial (Sa e Sz) de uma resina acrílica termopolimerizada incorporada por nitrato de cério e uma resina comercial (controle).
- Avaliar a dureza Vickers de uma resina acrílica termopolimerizada incorporada por nitrato de cério e uma resina comercial (controle).
- Mensurar ângulo de contato (θ) de uma resina acrílica termopolimerizada incorporada por nitrato de cério e uma resina comercial (controle).
- Determinar os parâmetros de cor (L*, a* e b*) de uma resina acrílica termopolimerizada incorporada por nitrato de cério e uma resina comercial (controle) através de espectrofotometria.



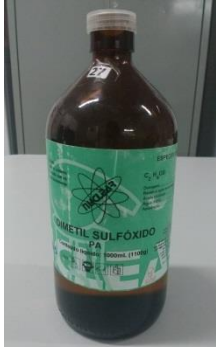



4. MATERIAL E MÉTODOS




4.1 Materiais

Os principais materiais utilizados neste estudo e suas respectivas marcas comerciais, origem e número de lote estão descritos no **Quadro 1**. O **Quadro 2** apresenta os equipamentos utilizados no estudo, suas marcas comerciais, origem e laboratórios nos quais estão localizados.

Quadro 1: Descrição dos principais materiais utilizados no estudo. Marca comercial, origem e lote.

Imagem	Material	Marca Comercial	Lote
	Adesivo instantâneo universal Viscosidade média	TekBond (Embu das Artes, Brasil)	M420A153
	Álcool etílico 95%	LabSynth Produtos para Laboratório Ltda (Diadema, Brasil)	190998
	Ágar Sabouraud Dextrose – Meio de cultura	Merck KGaA, (Darmstadt, Alemanha)	VM682938

	<p>Caldo Sabouraud Dextrose – Meio de cultura</p>	<p>Merck KGaA, (Darmstadt, Alemanha)</p>	<p>VM720639</p>
	<p>Cera nº 9</p>	<p>Destac Dente (São Paulo, Brasil)</p>	<p>01/13</p>
	<p>Dimetilsufóxido (DMSO) 99,5% de pureza</p>	<p>Casa da Química Ind. e Com. Ltda (Diadema, Brasil)</p>	<p>11030282</p>
	<p>Gesso Comum</p>	<p>Chaves Mineração (Ceará, Brasil)</p>	<p>-</p>
	<p>Isolante para gesso</p>	<p>Cel Lac, S. S White (Rio de Janeiro, Brasil)</p>	<p>0120512</p>
	<p>Mufla para polimerização por micro-ondas</p>	<p>Vipi-STG, Vipi (São Paulo, Brasil)</p>	<p>62769 51323</p>






	<p>Nitrato de cério hexahidratado ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Peso Molecular= 434,23)</p>	<p>Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, Brasil)</p>	<p>DCBD2448V</p>
	<p>Nistatina (100.000 UI/mL)</p>	<p>Dilecta, Farmácia Homeopática (João Pessoa, Brasil)</p>	<p>172933</p>
	<p>Pipeta graduada (100 μL e 1000 μL)</p>	<p>DIGPET (Curitiba, Brasil)</p>	<p>-</p>
	<p>Placa de 96 poços com fundo em "U"</p>	<p>Nunclon, Thomas Scientific NJ (USA)</p>	<p>-</p>
	<p>Placa de petri 150x20mm</p>	<p>KASVI (Curitiba, Brasil)</p>	<p>-</p>


	<p>Resina acrílica termopolimerizável rosa médio (pó e líquido)</p>	<p>Vipi Wave, Vipi (São Paulo, Brasil)</p>	<p>0000050618 0000053251</p>
	<p>Silicone especial para laboratório (massa e ativador)</p>	<p>Zetalabor, Zhermack (Badia Polesine, Italia)</p>	<p>189975</p>
	<p>2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TCT)</p>	<p>Dinâmica Química Contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil)</p>	<p>81893</p>
	<p>Tween 80</p>	<p>Dinâmica Química Contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil)</p>	<p>55055</p>
	<p>Vaselina sólida industrial</p>	<p>Carflex (São Paulo, Brasil)</p>	<p>0971</p>

Quadro 2: Equipamentos utilizados no estudo. Marca comercial, origem e laboratório nos quais estão localizados.

Imagem	Equipamento	Marca Comercial e origem	Localização
	Forno de micro-ondas doméstico	Panasonic, Perfect 800W (Osaka, Japão)	LABIO/UFPB
	Balança analítica de precisão	AX 200, SHIMADZU (Kyoto, Japão)	LACEC/UFPB
	Câmera fotográfica digital	CANON EOS Rebel T3i (Canon, Japão)	LABIO/UFPB
	Espectrofotômetro (leitor de microplacas)	Glomax Multi Detection System, Madison, Wisconsin, EUA	LACEC/UFPB

	<p>Estufa microbiológica 37°C</p>	<p>Sterilifer (Diadema, Brasil)</p>	<p>LABIMIC/UFPB</p>
	<p>Lavadora Ultrassônica</p>	<p>BioWash STD, Bio Art (São Paulo, Brasil)</p>	<p>LABIO/UFPB</p>
	<p>Lixadeira Politriz Universal</p>	<p>Arapol E, Arotec (São Paulo, Brasil)</p>	<p>LABIO/UFPB</p>
	<p>Motor elétrico</p>	<p>LB-100, Beltec (Araraquara, Brasil)</p>	<p>LABIO/UFPB</p>
	<p>Perfilômetro óptico sem contato</p>	<p>CCI MP, Taylor Hobson (Leicester, Inglaterra)</p>	<p>LABIO/UFPB</p>

	<p>Prensa hidráulica</p>	<p>PM 2000, Nova Techno (São Paulo, Brasil)</p>	<p>LABIO/UFPB</p>
	<p>Vibrador para gesso</p>	<p>Essence Dental (Araraquara, SP, Brasil)</p>	<p>LABIO/UFPB</p>
	<p>Vórtex</p>	<p>Mixer, Vision Scientific Co., Ltda (Korea)</p>	<p>LABIMIC/UFPB</p>
	<p>Microdurômetro Shimadzu</p>	<p>HMV Micro Hardness Test, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão</p>	<p>Laboratório de Materiais Dentários/UFPB</p>
	<p>Espectrofotômetro</p>	<p>Vita Easy Shade, Vita ZahnFabrick, Alemanha</p>	<p>LABIO/UFPB</p>

	<p>Agitador magnético sem aquecimento (SP-10003/S SPLABOR, São Paulo, Brasil)</p>	<p>SPLABOR, São Paulo, Brasil</p>	<p>LABIO/UFPB</p>
---	---	---	-------------------

4.2 Métodos

4.2.1 Grupos amostrais

As **Tabelas 1, 2 e 3** apresentam os números de repetições e corpos-de-prova utilizados para cada ensaio realizado.

Tabela 1: Número de repetições utilizadas nos ensaios microbiológicos.

Grupo	Microdiluição	Biofilme em placa
Controle de esterilidade	n = 3	n = 5
Grupo controle (Nistatina)	n = 3	n = 5
Solução DMSO+Cério	n = 3	n = 5
Solução DMSO+Tween+Cério	n = 3	n = 5

Tabela 2: Número de corpos-de-prova utilizados no ensaio de aderência fúngica em resina acrílica termopolimerizável

Grupos	Ensaio de aderência fúngica
Resina sem modificação (Grupo controle)	n = 10
Resina modificada por DMSO+Cério na concentração de 16xCIM (DC 16xCIM)	n = 10
Resina modificada por DMSO+Tween+Cério na concentração de 16xCIM (DTC 16xCIM)	n = 10
Resina modificada por DMSO+Cério na concentração de 32xCIM (DC 32xCIM)	n = 10
Resina modificada por DMSO+Tween+Cério na concentração de 32xCIM (DTC 32xCIM)	n = 10

Tabela 3: Número dos corpos-de-prova utilizados para os ensaios físico-mecânicos.

Grupos	MEV	Rugosidade superficial	Dureza Vickers	Ângulo de contato	Parâmetro de cor
Resina sem modificação (Grupo controle)	n = 1	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20
Resina modificada por DMSO+Cério na concentração de 16xCIM (DC 16xCIM)	n = 1	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20
Resina modificada por DMSO+Tween+Cério na concentração de 16xCIM (DTC 16xCIM)	n = 1	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20
Resina modificada por DMSO+Cério na concentração de 32xCIM (DC 32xCIM)	n = 1	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20
Resina modificada por DMSO+Tween+Cério na concentração de 32xCIM (DTC 32xCIM)	n = 1	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20

4.2.2 Local da pesquisa

Os estudos de investigação da atividade antifúngica foram desenvolvidos no Laboratório de Cultivo Celular (LACEC) e no Laboratório de Microbiologia (LABIMIC) da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os ensaios físico-morfológicos e mecânico foram desenvolvidos no Laboratório Integrado de Biomateriais (LABIO), Laboratório de Materiais Dentários, ambos do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba e no Laboratório de Tecnologia de Novos Materiais (TECNOMAT) do Centro de Tecnologia (CT) da Universidade Federal da Paraíba.

4.2.3 Ensaio microbiológico

4.2.3.1 Preparo das soluções químicas

Para o preparo das soluções de cério utilizou-se como precursor o Nitrato de Cério hexahidratado ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda , São Paulo, Brasil) de peso molecular 434,23, o qual foi dissolvido em dois tipos de soluções solventes:

-Dimetilsufóxido (DMSO) a 10%: Através de pipeta graduada, proporcionou-se 1 mL de DMSO e 9 mL de água deionizada (obtidas no LABIMIC), os quais foram misturados em tubo falcon e submetidos a agitação no vórtex durante 3 minutos.

-Dimetilsufóxido a 5% + Tween 80 a 5%: Através de pipeta graduada, proporcionou-se 0,50 mL de Tween, 0,50 mL de DMSO e 9 mL de água deionizada (obtidas no LABIMIC), os quais foram misturados em tubo falcon e submetidos a agitação no vórtex durante 3 minutos.

Em seguida, pesou-se em dois becker de vidro 0,26g de nitrato de cério, os quais foram adicionados às soluções solventes previamente preparadas e submetidos a agitador magnético sem aquecimento (SP-10003/S SPLABOR, São Paulo, Brasil) durante 5 minutos. Conseguiu-se dessa forma uma solução-

mãe para os dois tipos de soluções-solventes com uma concentração de nitrato de cério de 26mg/ml ou 26.000 µg/ml.

Como referência para a concentração inicial estipulada, usou-se uma solução 10 x mais concentrada do que os valores de Concentração Inibitória Mínima contra cepas de *Candida albicans* ATCC 90028 apontada por COBRADO et al., 2012, a qual foi de $2,6 \times 10^3$ mg/L ou 2,6 mg/ml (COBRADO et al., 2012; SILVA-DIAS et al., 2015).

4.2.3.2 Preparo das cepas de *Candida albicans*

Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* ATCC 90028. Para o procedimento de preparação do inóculo dos fungos, os isolados foram cultivados em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). Inicialmente foram preparadas suspensões dos micro-organismos em tubos contendo 5 mL de meio Caldo Sabouraud Dextrose e incubados a 37°C por 48 horas. Decorrido este tempo, as suspensões foram ajustadas e padronizadas em espectrofotômetro até atingir valor corresponde a um inóculo de aproximadamente $2,5 \times 10^3$ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) (SAHIN et al., 2004; SOUZA et al., 2007)

4.2.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada através da técnica de microdiluição segundo a Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (NCCLS, 2003). Para isto, utilizou-se placas de microdiluição de 96 poços, com fundo em forma de “U” Em cada poço da placa, adicionou-se 100 µL do meio Caldo Sabouraud Dextrose (CSD). Posteriormente, 100 µL das soluções testes foram dispensados nas cavidades da primeira coluna da placa, que foram diluídos seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, obtendo-se concentrações de 6500 µg/mL até 3,17 µg/mL, de modo que na primeira coluna da placa encontra-se a

maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, adicionou-se 100 µL do inóculo das espécies de *Candida* nas cavidades. Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do CSD e 100 µL do inóculo da espécie fúngica. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação das soluções (DSMO e DMSO+Tween 80), fez-se um controle negativo no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo, 100 µL do DMSO e 100 µL da suspensão; e 100 µL do caldo, 100 µL do DMSO+Tween 80 e 100 µL da suspensão. Adicionou-se também o controle positivo Nistatina 100.000 UI (obtida através de farmácia de manipulação Dilecta® - João Pessoa/PB). As placas foram seladas e incubadas a 37°C de 24 à 48h. No intervalo de 24 horas adicionou-se o TCT (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio), corante utilizado para melhor visualizar o crescimento fúngico. Definiu-se a CIM para os produtos testados como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o controle de crescimento. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3) e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos ensaios (SAHIN et al., 2004; SOUZA et al., 2007). A **Figura 1** mostra um esquema final da placa de microdiluição.

Figura 1: Esquema da placa de microdiluição. Após a diluição seriada, a placa contendo as substâncias testes e controles apresentou-se da seguinte forma:

Vermelho: Solução DMSO+Céριο

Verde: Solução DMSO+Céριο+Tween

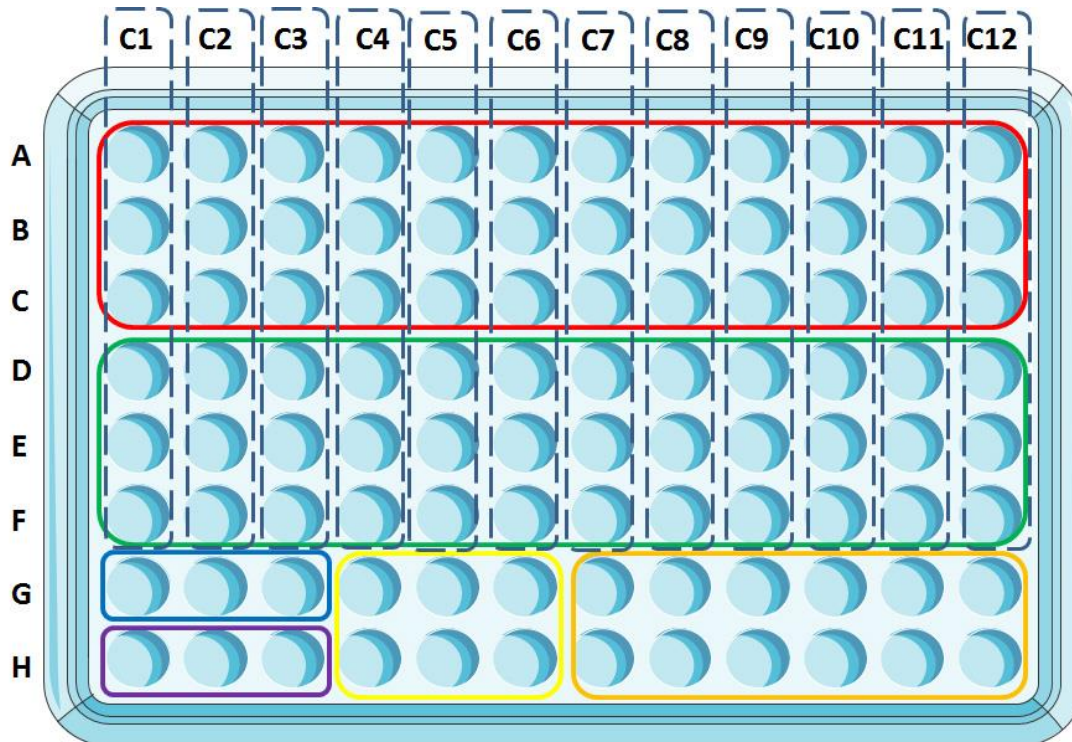
Azul: Controle positivo (nistatina)

Roxo: Controle de crescimento

Amarelo: Controles negativos (DMSO; DMSO+Tween)

Laranja: Controle de esterilidade

C1: 6500 µg/ml; C2: 3250 µg/ml; C3: 1625 µg/ml; C4: 812,5 µg/ml; C5: 406,25 µg/ml; C6: 203,12 µg/ml; C7: 101,56 µg/ml; C8: 50,78 µg/ml; C9: 25,39 µg/ml; C10: 12,70 µg/ml; C11: 6,35 µg/ml; C12: 3,17 µg/ml.



4.2.3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após determinação da CIM, a concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas, bem como os controles positivos e negativos foram subcultivadas em placas de Ágar Sabouraud Dextrose. Após 48 horas de incubação a 37°C, as leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM a menor concentração da droga que impediu o crescimento visível do subcultivo.

4.2.3.5 Efeito das soluções de Nitrato de Cério na redução do biofilme maduro de *C. albicans*

Em placas de microdiluição de 96 poços adicionou-se 100 µL do meio Caldo Sabouraud Dextrose e 100 µL do inóculo com $2,5 \times 10^5$ UFC, as quais foram incubadas por 48 horas a 37°C. Após a formação do biofilme, o conteúdo dos poços foi retirado e lavado duas vezes com 250 µL de PBS (Tampão fosfato-salino) estéril. Em seguida, inseriu-se na placa com o crescimento do biofilme, 100 µL das substâncias previamente preparadas: soluções de Nitrato de Cério diluído em DMSO a 10% e Nitrato de Cério diluído em DMSO a 5% + Tween 80 a 5%, nas concentrações CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8 e CIMx16. Os grupos controles utilizados neste ensaio foram: crescimento de leveduras (controle de crescimento), nistatina (controle positivo), solução de DMSO e solução de DMSO+Tween 80 (controles negativos). As placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 e 48 horas.

Após 24 horas de incubação (**Figura 2**), removeu-se o conteúdo dos poços de uma placa e lavou-se duas vezes com 250 µL de PBS estéril. Esperou-se secar por 45 minutos à temperatura ambiente, acrescentou-se 200 µL de cristal de violeta 0,4% por 45 minutos (**Figura 3**), lavou-se com 250 µL de água destilada quatro vezes e acrescentou-se 200 µL de etanol à 95% para descolorir durante 45 minutos. Após esse período, 100 µL da solução descolorida foram transferidos para uma nova placa de fundo chato (**Figura 4**) e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595nm. Os poços com as soluções testes foram comparados com o controle de crescimento.

Realizou-se o mesmo procedimento com a segunda placa após 48 horas de incubação.

Os ensaios foram realizados em quintuplicata (n=5) com controles de esterilidade e de crescimento. A redução do biofilme (%) foi medida indiretamente considerando a absorbância do controle de crescimento como 100% de aderência fúngica, de acordo com a **Fórmula 1** (metodologia adaptada de (DJORDJEVIC, 2002; GALVÃO et al., 2012; SILVA et al., 2011).

Fórmula 1: Fórmula para calcular a porcentagem de inibição de crescimento fúngico.

$$I (\%) = 100 \left[\frac{\text{Grupo teste} \times 100}{\text{Controle de crescimento}} \right]$$

Figura 2: Placa contendo as soluções testes após 24 horas de incubação.

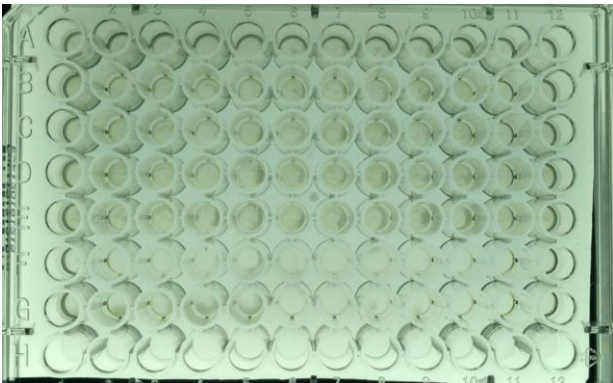


Figura 3: Adição do cristal de violeta 0,4% em todos os poços.

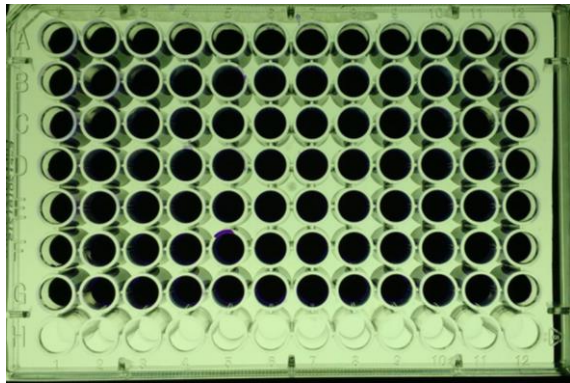
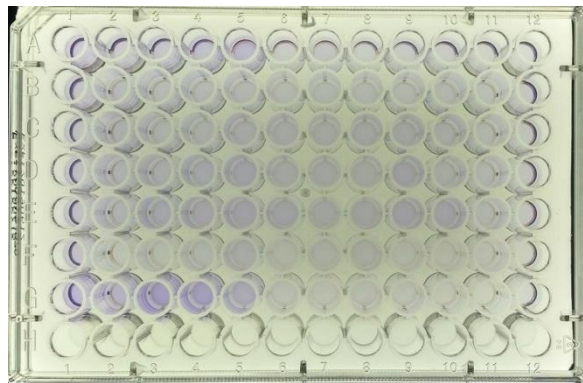


Figura 4: Placa com 100 µL da solução descolorida com álcool 95%.



4.3 Confeção dos corpos-de-prova

4.3.1 Confeção dos corpos-de-prova de resina acrílica incorporadas com solução de nitrato de cério

Para a obtenção dos corpos-de-prova, utilizou-se uma matriz metálica cilíndrica em aço inoxidável com as dimensões de 10 mm de diâmetro por 5 mm de altura (QUEIROZ, 2013), a qual foi moldada com com silicona de adição (Elite, Zhermack, Itália) pela técnica simultânea empregando-se um pedaço de cano de PVC de 30 mm de diâmetro como moldeira (**Figura 5**). No interior do espaço criado pelo disco na silicona, verteu-se cera número 9 (Destac Dent, São Paulo, Brasil) derretida. Após o resfriamento, as réplicas em cera foram removidas da matriz e incluídas em muflas de fibra de vidro (STG, Vipi, São Paulo, Brasil) (**Figura 6**) previamente vaselinadas.

Figura 5: Molde de silicona



Figura 6: Mufla de fibra de vidro



Para o preenchimento da base da mufla, empregou-se 150g de gesso comum (**Figura 7**) para 75mL de água, espatulado manualmente durante um minuto e vazado no interior da mufla sob vibrador odontológico (Essence dental, Araraquara, Brasil). Após o preenchimento, uma placa de vidro com 3 mm de espessura foi acomodada sobre o gesso (**Figura 8**), de forma que ficasse paralela à borda da base da mufla e aguardou-se o tempo de presa do gesso (30 minutos).

Figura 7: 150g de gesso comum

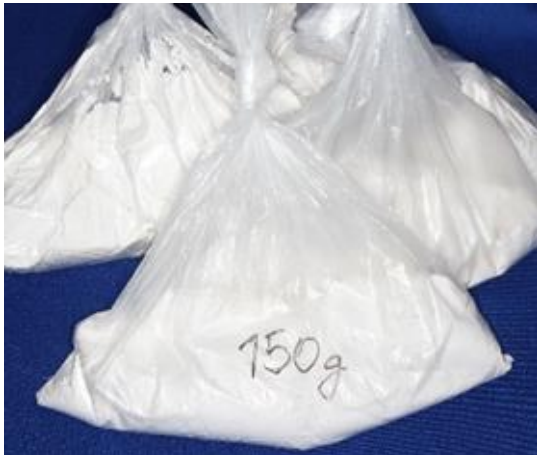


Figura 8: placa de vidro acomodada sobre a mufla.



Sobre a placa de vidro, fixou-se os padrões de cera com o auxílio de um adesivo instantâneo universal TekBond, (Tekbond, Embu das Artes, Brasil) (**Figura 9**) e sobre estes foi acomodada silicone laboratorial (Zetalabor, Zhermack, Rovigo, Itália), manipulado conforme as instruções do fabricante) (**Figura 10**), pressionando bem para evitar espaços vazios. Após a presa (5 minutos), o gesso foi isolado (Cel Lac, S.S White, Rio de Janeiro, Brasil) e acoplou-se a contra-mufla vaselinada. A mufla foi devidamente fechada, parafusada e preenchida sob vibração com gesso comum na proporção de 250g de pó para 125mL de água (**Figura 11**). Aguardou-se o tempo de uma hora para sua presa total.

Figura 9: Base da mufla preenchida com gesso sobre o qual foi acomodada uma placa de vidro. Padrões de cera fixados com cola sobre a placa de vidro.



Figura 10: Conjunto placa de vidro + padrões de cera recobertos por silicone laboratorial.



Figura 11: Mufla fechada, parafusada e preenchida sob vibração com gesso comum.



Passado este tempo, a mufla foi aberta e após a remoção dos padrões de cera, foi lavada com água morna. Secou-se a placa de vidro e os restos de cera foram removidos com algodão embebido em álcool (**Figura 12**). A mufla e contra-mufla foram novamente vaselinadas e o gesso isolado.

Figura 12: Mufla aberta e devidamente limpa dos resíduos de cera.



A resina acrílica ativada termicamente por energia de micro-ondas de cor rosa médio (Vipi Wave, Vipi, São Paulo, Brasil) foi proporcionada de acordo

com as instruções do fabricante (6,5mL do monômero/ 14g do polímero) e manipulada em pote de vidro com tampa utilizando-se espátula plástica fornecida pelo fabricante. O pó da resina foi pesado em balança analítica com precisão de 0,00001g, enquanto o líquido foi proporcionado por meio de pipeta graduada (1/100mL) acoplada a um pipetador. Para o grupo controle foi utilizado apenas o monômero.

Para cálculo da concentração de solução de cério a ser incorporada e tendo em vista as instruções do fabricante (6,5ml do monômero/ 14g do polímero), verificou-se que para cada 1 ml de monômero, correspondem 2,15 g do polímero, o equivalente a 1,8 ml, levando-se em conta a densidade do PMMA (1,19 g/cm³) (KASINA et al., 2014). Optou-se por incorporar 20% das soluções experimentais (0,2 ml) para cada 1 ml de monômero, o que corresponde a 1/15 do volume total de resina (1,2 ml de líquido + 1,8 ml de polímero = 3 ml de volume total de resina). Buscando-se incorporar uma quantidade de nitrato de cério correspondente pelo menos à CIM e 2xCIM no volume total de resina, trabalhou-se então com a solução 16xCIM e 32xCIM, o correspondente a 26.000 µg/ml e 52.000 µg/ml.

Para os grupos experimentais, (DC 16xCIM, DC 32xCIM, DTC 16xCIM e DTC 32xCIM) incorporou-se então 20% das soluções 16xCIM e 32xCIM de nitrato de cério (dissolvidas em DMSO 10% e DMSO 5% + Tween 5%) (1,3 ml) a 6,5 ml do monômero. Quando na fase plástica, a resina foi acomodada nos espaços criados após a remoção das réplicas em cera, sobre as quais colocou-se um filme plástico que acompanha o produto (**Figura 13**).

Figura 13: Preenchimento dos espaços da mufla com resina acrílica.

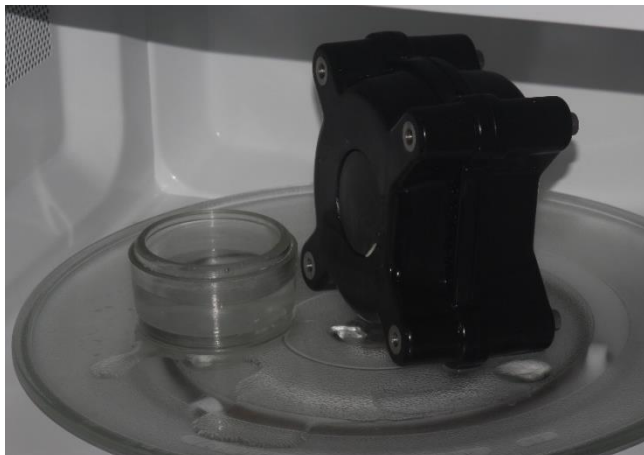


A mufla foi fechada e levada para prensa hidráulica (PM 2000, Nova Techno, São Paulo, Brasil), aplicando-se uma carga progressiva e lenta até 0,5 tonelada por 5 minutos, permitindo assim o escoamento dos excessos de resina. Decorrido este período, a mufla foi retirada da prensa e aberta. Removeu-se o filme plástico e os excessos de resina acrílica foram extraídos com uma lâmina de bisturi. A mufla foi novamente fechada e prensada gradativamente até a carga de uma tonelada, a qual foi mantida por 20 minutos (**Figura 14**). Após esse período, apertou-se os parafusos da mufla e esta foi levada ao forno de micro-ondas (Perfect, Panasonic, Japão) juntamente com um recipiente de vidro contendo 120mL de água (**Figura 15**). Realizou-se o ciclo de polimerização recomendado pelo fabricante para fornos de 800W, com 20 minutos iniciais na potência 2, seguidos de 5 minutos na potência 6.

Figura 14: Mufla na prensa hidráulica



Figura 15: Mufla e recipiente com água no forno micro-ondas.



Após o ciclo de polimerização, a mufla foi retirada do micro-ondas e colocada numa bancada para resfriar lentamente até a temperatura ambiente. As amostras foram demufladas e os excessos de resina foram removidos com broca de tungstênio (Maxicut, Labordental, São Paulo, Brasil) montada em motor elétrico (LB-100, Beltec, Araraquara, Brasil) (**Figura 16**). Depois passaram por um processo de acabamento utilizando-se lixas d'água (3M do Brasil, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) de granulação crescente (200, 400, 600 e 1200) e polimento com disco de feltro (ERIOS Equipamentos

Técnicos e Científicos LTDA, São Paulo, São Paulo, Brasil) embebido em pasta de alumina (ERIOS Equipamentos Técnicos e Científicos LTDA, São Paulo, São Paulo, Brasil), todos montados em politriz a 200 rpm sob refrigeração (Arapol E, Arotec, São Paulo, Brasil) durante 30 segundos para cada granulação (**Figura 17**).

Figura 16: Motor elétrico utilizado para remover os excessos de resina acrílica.

Figura 17: Politriz com refrigeração.



Todos os corpos-de-prova passaram por um banho ultrassônico (BioWash STD, Bio Art, São Paulo, Brasil) com água destilada durante 15 minutos para remover detritos do polimento, foram secos delicadamente com papel absorvente (Kimberly-Clarck Brasil, São Paulo, Brasil) e armazenados à seco individualmente até a realização dos ensaios (**Figura 18**).

Figura 18: Corpo de prova após acabamento e polimento: (A) grupo controle, (B) DC 16xCIM, (C) DTC 16xCIM, (D) DC 32xCIM, (E) DTC 32xCIM.



4.3.2 Ensaio microbiológico de Inibição da aderência fúngica à resina acrílica termopolimerizável

Candida albicans (ATCC 90028) foi cultivada em 5 mL de Caldo Sabouraud Dextrose e incubada à 35° C de 24 à 48 horas. Posteriormente, 10 corpos-de-prova de resina acrílica, dos grupos Controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM e DTC 32xCIM foram alocados em placas de 24 poços e embalados com grau cirúrgico para serem esterilizados em óxido de etileno na empresa SETE Esterilização (Cabedelo, Paraíba). Em seguida, em cada poço contendo um corpo-de-prova, adicionou-se 1,9 ml de Caldo Sabouraud Dextrose e 100 µL da suspensão fúngica (10^6 UFC/ml), as quais foram incubadas a 35°C durante 48 horas. Após o período de incubação, os espécimes foram lavados com 1 ml de água destilada estéril e colocados em tubos falcons estéreis contendo 5 ml de solução salina (0,85% de NaCl). Os frascos foram agitados num aparelho Vortex durante 60 segundos. Após este procedimento 30 µl da solução diluída até uma concentração 10^{-4} foram semeados em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose, que foram incubadas a 35°C durante 48 horas. Em última análise, realizou-se a conversão de UFC/µl para UFC/ml. Os valores de mediana de UFC/ml de cada grupo foram então calculados (TRINDADE et al., 2015).

4.3.3 Caracterização físico-morfológica e ensaio mecânico

4.3.3.1 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das resinas acrílicas foi determinada por imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Um corpo de prova de cada grupo (Controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM, DTC 32xCIM) foi colocado no suporte de alumínio previamente limpo para ser recoberto por ouro/paládio através de um pulverizador catódico em alto vácuo (SCD 050, Baltec AG, Liechtenstein). Em seguida, o material foi examinado no Microscópio Eletrônico de Varredura (Quanta 450, FEI, Hillsboro, USA) operado a 15 kV. As imagens foram obtidas por elétrons retroespalhados e por elétrons secundários, com magnificação de 200 e 5000 vezes.

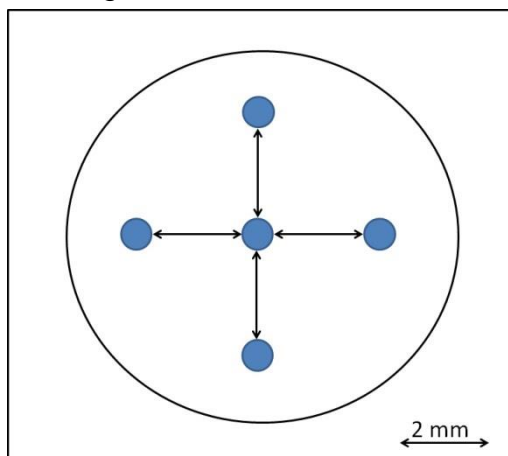
4.3.3.2 Análise Rugosimétrica (Sa e Sz)

A análise da rugosidade de superfície (Sa e Sz) foi realizada no aparelho de perfilometria óptica sem contato (CCI MP, Taylor Hobson, Inglaterra) (**Figura 19**) conectado a uma unidade computadorizada contendo o software Talysurf CCI (Taylor Hobson, Inglaterra) para obtenção dos dados. Utilizou-se um cutoff de 0,25 mm com uma lente 20x, abertura numérica de 0.4 e velocidade de escaneamento de x1 no modo xyz. Realizou-se cinco mensurações para cada corpo-de-prova (n=20), sendo uma na área central e as demais de acordo com a movimentação da lente 2mm para a direita, para a esquerda, para baixo e para cima, seguindo o desenho de uma cruz (**Figura 20**). A rugosidade final dos padrões Sa e Sz (μm) foi obtida através da média dos cinco pontos de cada corpo-de-prova.

Figura 19: Aparelho de perfilometria óptica sem contato.



Figura 20: Esquema ilustrativo do padrão em cruz utilizado para seleção das áreas de mensuração da rugosidade.



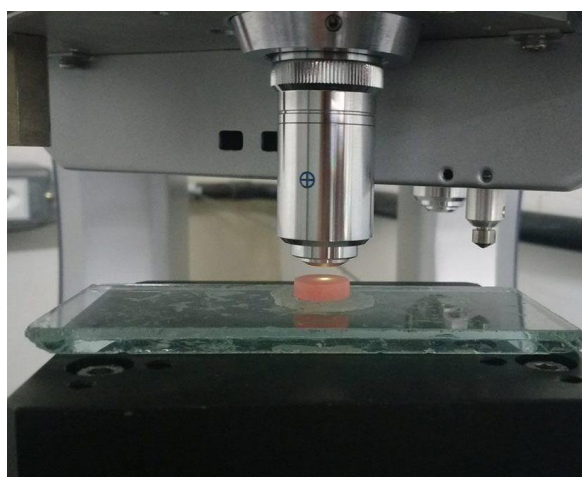
4.3.3.3. Análise da dureza Vickers

Para as leituras de dureza Vickers, os corpos de prova (n=20) foram submetidos a três leituras de dureza em um Microdurômetro Shimadzu (HMV Micro Hardness Test, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (**Figuras 21 e 22**), do Laboratório de Materiais Dentários - UFPB, com carga de 4,1N por 30 segundos (AYAZ et al., 2014). Os corpos-de-prova de resina acrílica permaneceram paralelos à mesa do microdurômetro e com estabilidade, permitindo a marcação pela ponta Vickers. Após a indentação, o operador do equipamento mediu as diagonais criadas pelo diamante no corpo-de-prova e o equipamento automaticamente converteu as medias em unidades de dureza Vickers (kg/mm^2) com uma escala de dois décimos de precisão. Ao final das três leituras em cada corpo-de-prova, foi registrada a média delas.

Figura 21: Durômetro HMV Micro Hardness Test



Figura 22: Corpo de prova posicionado para mensuração da dureza Vickers

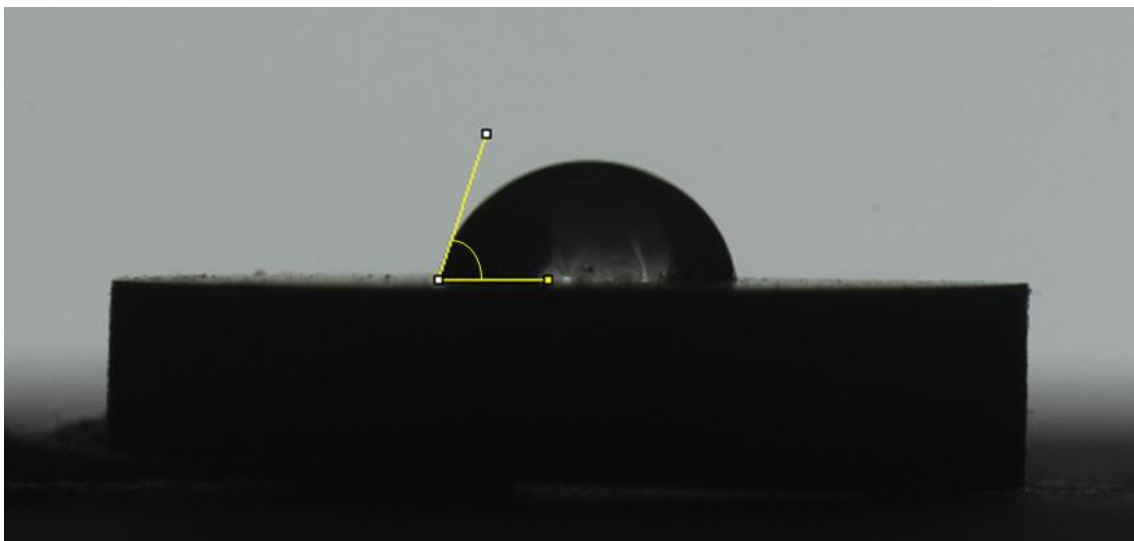


4.3.3.4. Análise do ângulo de contato

O ângulo de contato (θ) foi medido através da distribuição de uma gota (10 μL) de água deionizada por uma pipeta de precisão (ecopipette 0,5-10 μl , CAPP, Dinamarca) sobre a superfície dos corpos-de-prova (n=20). Fotografias padronizadas das gotículas foram obtidas através de uma câmera digital (CANON EOS REBEL T3i, lente Vivitar 100mm autofocus Macro, no modo manual, ISO 100, regulagem de obturador 1/80 e diafragma f22), montada em tripé, em 10 momentos: imediatamente ao contato da gota com o corpo-de-prova e fotografias adicionais foram registradas a cada 10 segundos, até um

total de 90 segundos, resultando em 10 fotos por espécime. Os ângulos de contato (θ) foram medidos (Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) a partir das fronteiras esquerda e direita da imagem ampliada ao ponto de intersecção entre ar-água-espécime, sendo realizada uma média dos dois ângulos de cada imagem (**Figura 23**) (STRAIOTO et al., 2010a). Os valores das médias do ângulo de contato de cada grupo foram então calculados.

Figura 23: Mensuração do ângulo de contato no software ImageJ.



4.3.3.5 Análise dos parâmetros de cor

Para avaliar os parâmetros de cor (sistema colorimétrico **CIE L* a* b***) dos corpos de prova, utilizou-se um espectrofotômetro portátil de uso odontológico (Vita Easy Shade, Vita ZahnFabrick, Alemanha) (**Figura 24**) (GREGORIUS et al., 2012). Os corpos de prova (n=20) foram colocados sobre uma superfície branca, a fim de padronizar o local da mensuração de cor de todos os corpos de prova. O espectrofotômetro foi calibrado de acordo com o padrão de calibração fornecido pelo fabricante (**Figura 25**) (HONG et al., 2009). Três tomadas de cor foram realizadas para cada espécime (**Figura 26**), sendo uma média depois feita para cada corpo-de-prova, pelas unidades de **CIE L* a* b***. Este sistema baseia-se em três parâmetros para a definição de cor: **L***, **a***, e **b***. O parâmetro **L*** representa o brilho (branco-preto), **a*** representa o

vermelho-verde, e b^* representa o amarelo-azul. Os valores do espaço de cor L^* , a^* e b^* podem ser positivos ou negativos, sendo maiores valores positivos mais claro, vermelho e amarelo para as três escalas, respectivamente, e maiores valores negativos mais escuro, verde e azul.

As diferenças de cor foram avaliadas usando-se os valores médios de cada componente (**Figura 27**).

Figura 24: Espectrofotômetro Vita Easy Shade



Figura 25: Calibração do espectrofotômetro



Figura 26: Tomada de cor da resina acrílica.



Figura 27: Sistema colorimétrico CIE $L^*a^*b^*$



4.4 Análise estatística

Os resultados dos testes de CIM, CFM e MEV foram analisados descritivamente. Todos os outros resultados foram tabulados em banco de dados criado no programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 19.0 e submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para os dados relativos ao biofilme em placa, à rugosidade (S_a e S_z), à dureza Vickers, aos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e ao ângulo de contato foi encontrada uma distribuição normal (Shapiro-Wilk= $p>0,05$); a diferença entre as médias dos grupos foi verificada por meio da Análise de Variância (ANOVA) para rugosidade, dureza Vickers, parâmetros de cor e ângulo de contato e Análise de Variância de 2 fatores (Two-Way ANOVA) para biofilme em placa, sendo complementados com o teste Tukey e demonstrados através de tabelas com média e desvio-padrão. O teste de Levene resultou em $p<0,05$, demonstrando que a igualdade de variâncias não foi atendida. Dessa forma, adotou-se um nível de significância de 1% para os testes de biofilme em placa, rugosidade, dureza, ângulo de contato e para os parâmetros a^* e b^* de cor ($\alpha=0,01$). Para o parâmetro L^* da cor, o teste de Levene resultou em $p>0,05$, demonstrando que a igualdade de variâncias foi atendida, permitindo a adoção de um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Para os dados relativos à inibição da aderência fúngica nos corpos de prova foi encontrada uma distribuição não-normal (Shapiro-Wilk= $p<0,05$); sendo aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney U com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para identificar as diferenças entre os grupos e os resultados demonstrados através de tabela com mediana e distância interquartil.

5. Resultados

5.1 Determinação da CIM e CFM

A CIM e CFM da solução de nitrato de cério contra *Candida albicans* (ATCC 90028) foi de 1625 $\mu\text{L}/\text{mL}$, como está representado nas **figuras 28** e **29**, respectivamente. A **figura 28** mostra o resultado do teste de microdiluição para a determinação da CIM, o qual revela que a partir do quarto poço houve crescimento fúngico, com turvação e formação de botões no fundo dos poços, além da coloração avermelhada pelo corante TCT, tanto para a solução DMSO+cério (Linhas A, B e C), quanto para a solução DMSO+Tween+cério (Linhas C, D e E). Para ambas soluções, a CIM apresentou-se no terceiro poço, numa concentração correspondente a 1625 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Alíquotas dos poços correspondentes à CIM, CIMx2 e CIMx4 foram plaqueadas para a determinação da CFM (**figura 29**), confirmando que não houve crescimento fúngico nas três concentrações testadas.

Figura 28: Placa da determinação da CIM da solução de nitrato de cério.

Vermelho: Solução DMSO+Cério

Verde: Solução DMSO+Cério+Tween

Azul: Controle positivo (nistatina)

Roxo: Controle de crescimento

Amarelo: Controles negativos (DMSO; DMSO+Tween)

Laranja: Controle de esterilidade

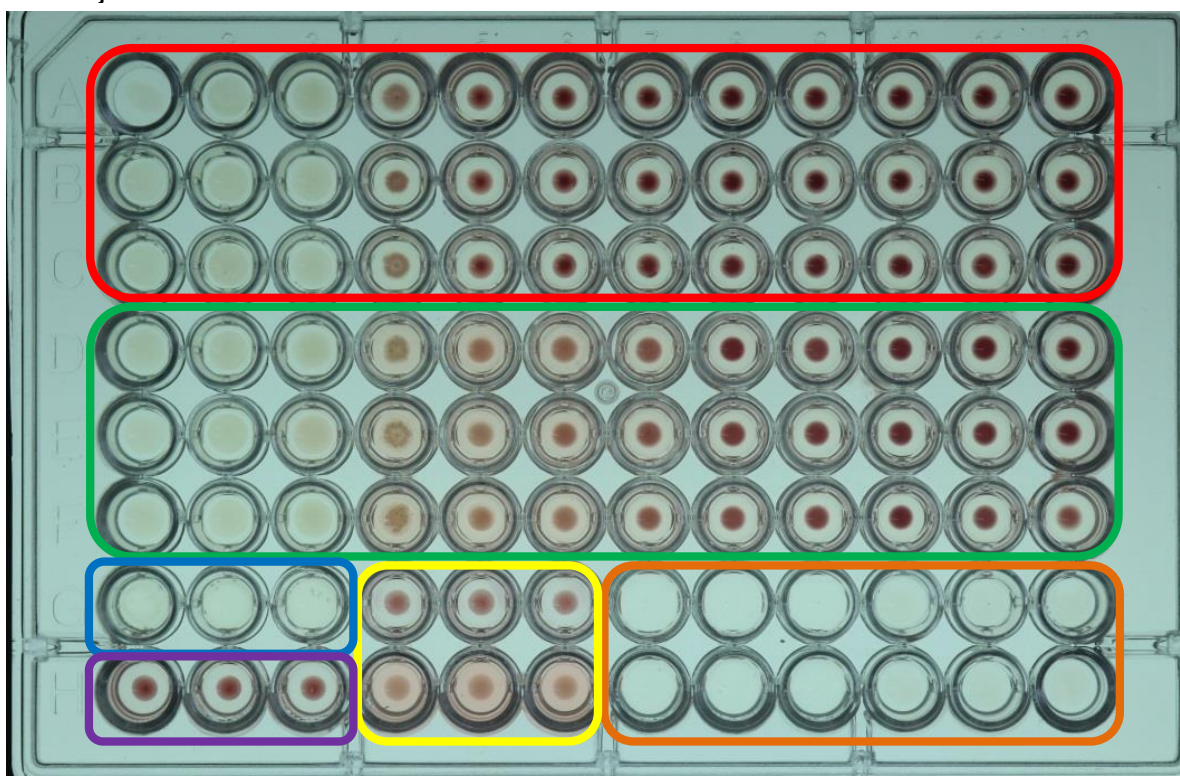
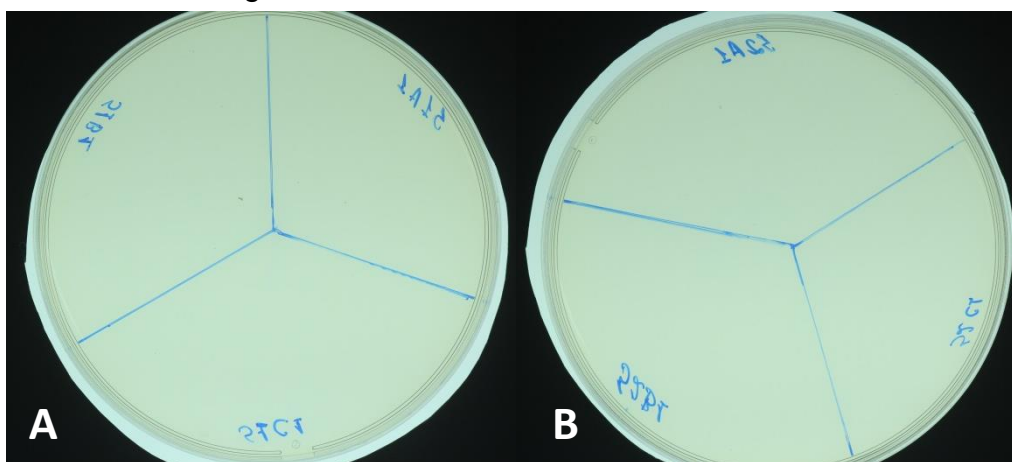


Figura 29: Placas da determinação da CFM da solução de nitrato de cério na CIM, CIMx2 e CIMx4, para a solução DMSO+cério (A) e solução DMSO+Tween+cério (B), mostrando ausência de crescimento fúngico.



5.2 Efeito da solução de nitrato de cério na redução do biofilme maduro de *C. albicans*

A **Tabela 4** apresenta o efeito das soluções testes sobre a redução do biofilme de *C. albicans* (%) nos dois intervalos de tempo (24 e 48 horas) e as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e entre os intervalos de tempo. Houve inibição do biofilme para todos os grupos e os grupos DMSO+Cério e DMSO+Tween+Cério apresentaram valores de inibição superiores a 87% (24 horas) e 62% (48 horas), com diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (nistatina), que apresentou inibição de 51% (24 horas) e 49% (48 horas) em ambos os intervalos de tempo testados ($p < 0,01$).

Tabela 4: Representação da redução do biofilme (%) em função do intervalo de tempo.

DC - DMSO+Cério; DTC - DMSO+Tween+Cério.

Letras minúsculas idênticas nas linhas e letras maiúsculas idênticas nas colunas não diferenciam-se estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Intervalo de tempo	24 horas	48 horas
Grupos	Média (DP)	Média
Nistatina	51.30 (10.66) D a	49.33 (5.74) E a
DC CIM	87.04 (3.62) B a	92.24 (11.25) AB a
DC 2xCIM	88.60 (3.18) AB a	82.30 (10.45) BC a
DC 4xCIM	93.66 (4.06) AB a	75.61 (7.37) C b
DC 8xCIM	93.74 (4.14) AB a	81.35 (4.47) BC b
DC 16xCIM	74.07 (13.65) C a	96.70 (10.53) A b
DTC CIM	94.71 (5.14) AB a	89.05 (11.09) AB a
DTC 2xCIM	97.10 (5.78) AB a	62.74 (10.78) D b
DTC 4Xcim	98.48 (2.34) AB a	88.01 (6.07) AB a
DTC 8xCIM	100 (1.05) A a	90.56 (8.35) AB a
DTC 16xCIM	95.23 (6.02) AB a	98.05 (2.72) A a

5.3 Inibição da aderência fúngica aos espécimes de resina acrílica termopolimerizável

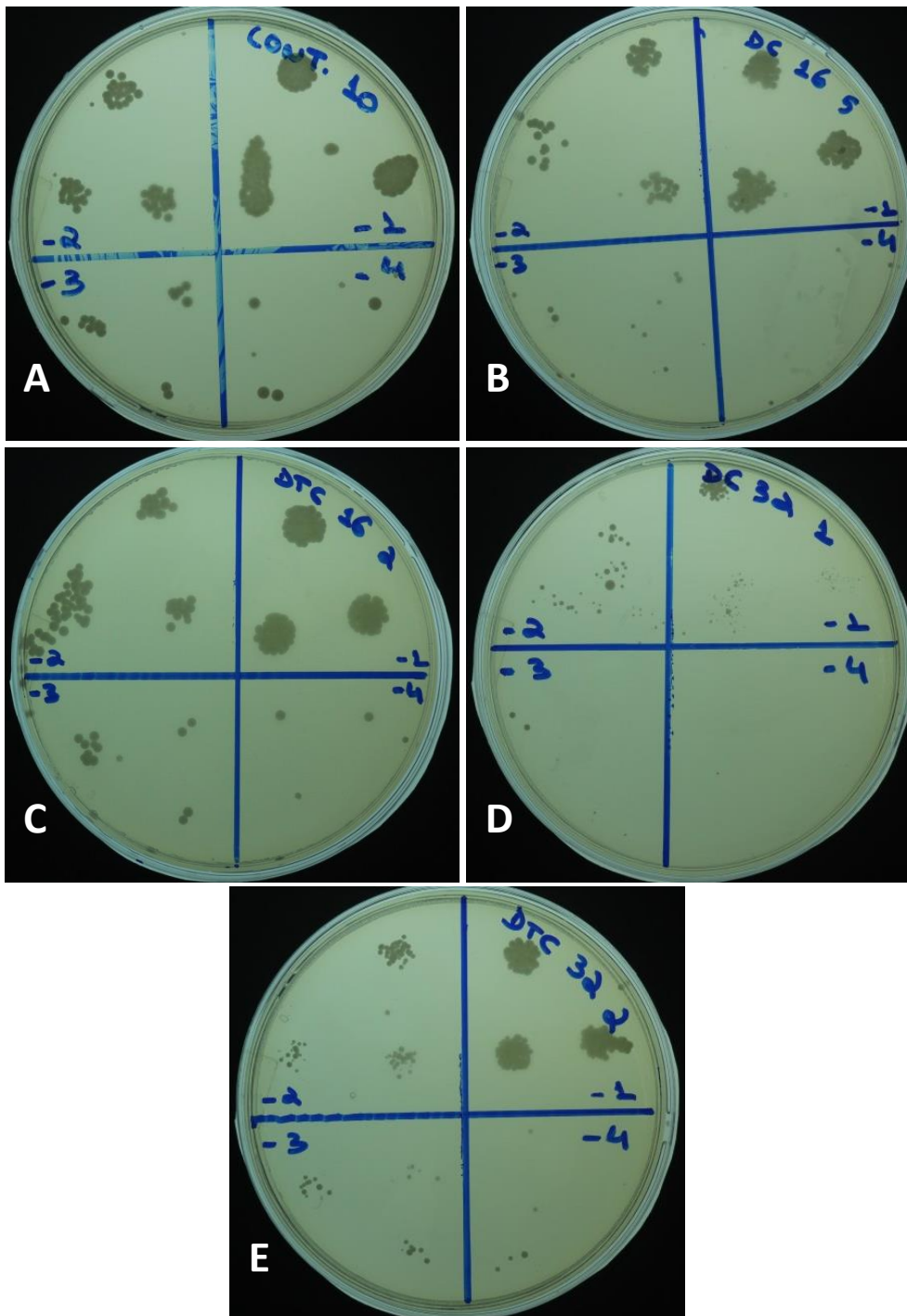
A **Tabela 5** apresenta o efeito da inibição da aderência fúngica a resinas acrílicas termopolimerizadas no intervalo de tempo de 24 à 48 horas e as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Os menores valores medianos de aderência fúngica ocorreram nos grupos DC 16xCIM e DC 32xCIM, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle. A **Figura 30** apresenta o resultado do plaqueamento de uma amostra de cada grupo testado.

Tabela 5: Valores da Mediana e Distância Interquartil (entre parênteses) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) para os grupos controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM e DTC 32xCIM.

Letras maiúsculas idênticas nas colunas não diferenciam-se estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney U ($p < 0,05$).

GRUPO	UFC/ml (mediana \pm IQ)
Controle	$1,66 \times 10^6 (\pm 1,33 \times 10^6)$ A
DC 16xCIM	$0,83 \times 10^6 (\pm 0,83 \times 10^6)$ B
DTC 16xCIM	$1,30 \times 10^6 (\pm 1,40 \times 10^6)$ AB
DC 32xCIM	$0,66 \times 10^6 \pm (0,66 \times 10^6)$ B
DTC 32xCIM	$0,88 \times 10^6 \pm (1,50 \times 10^6)$ AB

Figura 30: Plaqueamento de uma amostra dos grupos (A) Controle, (B) DC 16xCIM, (C) DTC 16xCIM, (D) DC 32xCIM, (E) DTC 32xCIM.

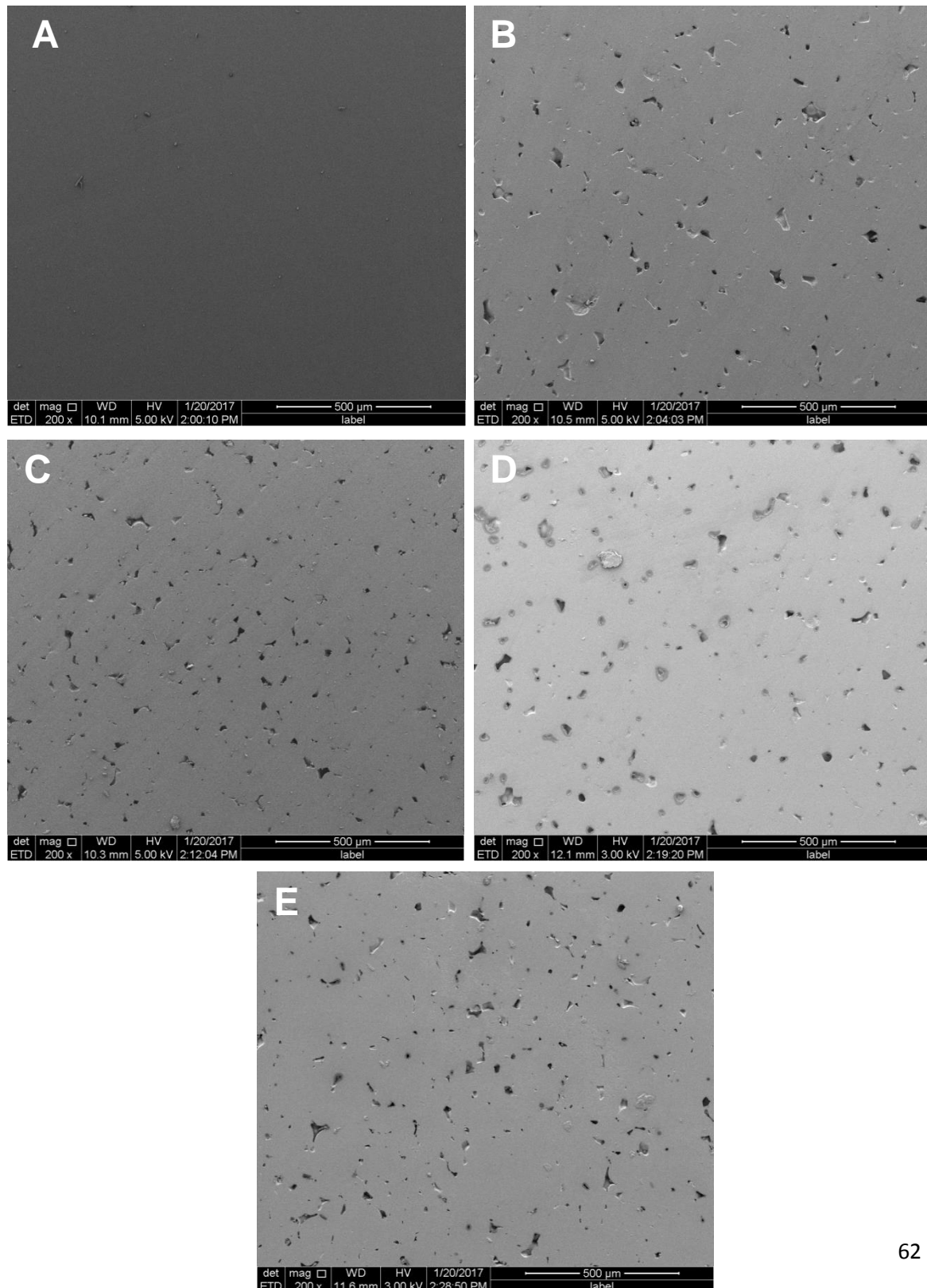


5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Micrografias da MEV permitiram observar, de forma qualitativa, as superfícies das amostras. A **Figura 31** mostra que os corpos-de-prova modificados por nitrato de cério apresentaram superfícies mais rugosas quando comparadas com o grupo controle, estando presente depressões em toda a

superfície, que pareceram aumentar em quantidade quando a concentração maior das soluções de cério foi utilizada (grupos DC 32xCIM e DTC 32xCIM).

Figura 31: Imagens da MEV em aumento de 200x das amostras dos grupos (A) Controle, (B) DC 16xCIM, (C) DTC 16xCIM, (D) DC 32xCIM, (E) DTC 32xCIM.



5.5 Rugosimetria

A **Tabela 6** apresenta os valores da Média e Desvio-padrão das rugosidades (S_a e S_z) para os grupos controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM e DTC 32xCIM. Para o padrão de rugosidade S_a , o grupo controle apresentou o menor valor de rugosidade com diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos ($p < 0,01$). No entanto, os grupos testes não apresentaram diferenças entre si. Para o padrão de rugosidade S_z , o grupo Controle também apresentou o menor valor com diferença estatisticamente significativa com os demais grupos. Nas **Figuras 32** à **36** pode-se observar a topografia superficial dos grupos avaliados através de imagens de perfilometria.

Tabela 6: Valores da Média e Desvio-padrão (entre parênteses) da rugosidade (S_a e S_z) para os grupos controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM e DTC 32xCIM.

Letras maiúsculas idênticas nas colunas não diferenciam-se estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Grupos	Sa (μm)	Sz (μm)
	Média (DP)	Média (DP)
Controle	0,052 (0,02) A	0,51 (0,21) A
DC 16xCIM	0,224 (0,03) B	2,34 (0,29) C
DTC 16xCIM	0,199 (0,06) B	1,92 (0,56) B
DC 32xCIM	0,202 (0,04) B	2,13 (0,35) BC
DTC 32xCIM	0,187 (0,03) B	1,88 (0,25) B

Figura 32: Imagem de perfilometria (objetiva de 20 X) mostrando aspecto da superfície de espécime do grupo controle

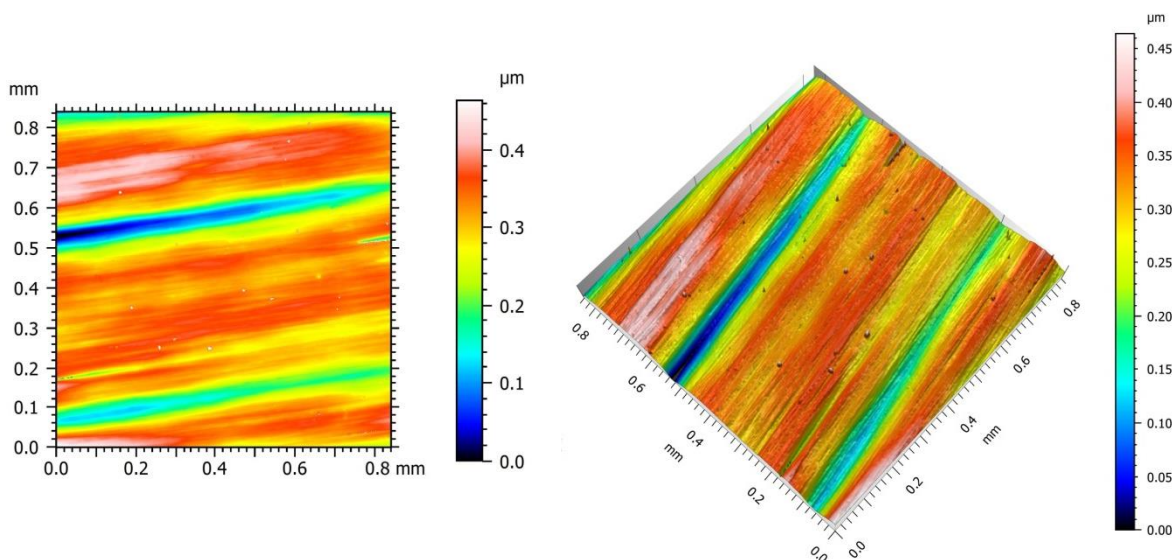


Figura 33: Imagem de perfilometria (objetiva de 20 X) mostrando aspecto da superfície de espécime do grupo DC 16xCIM.

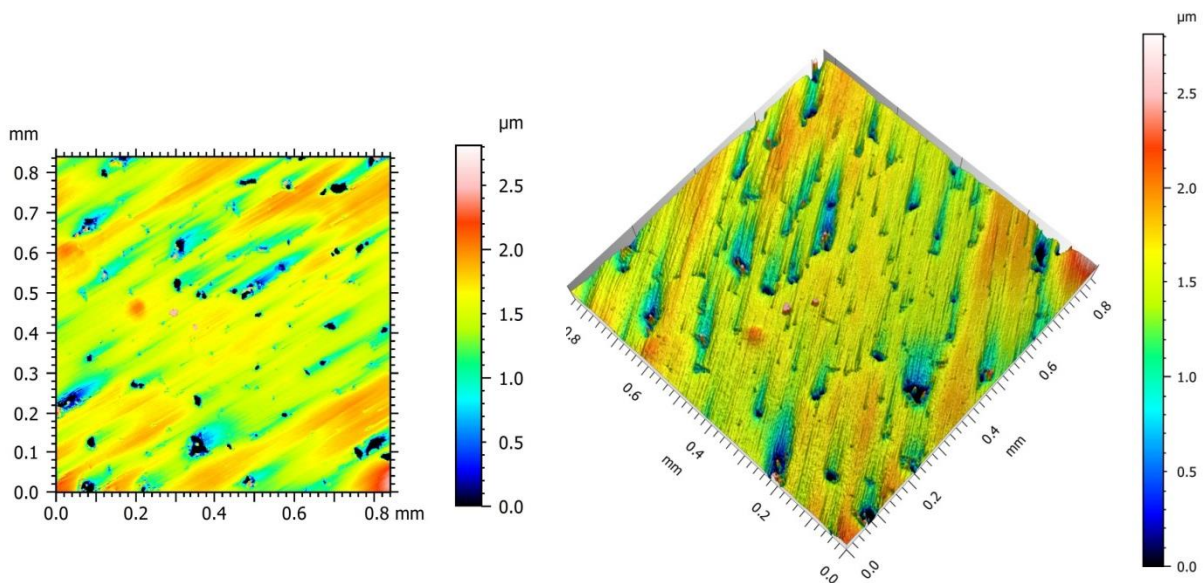


Figura 34: Imagem de perfilometria (objetiva de 20 X) mostrando aspecto da superfície de espécime do grupo DTC 16xCIM.

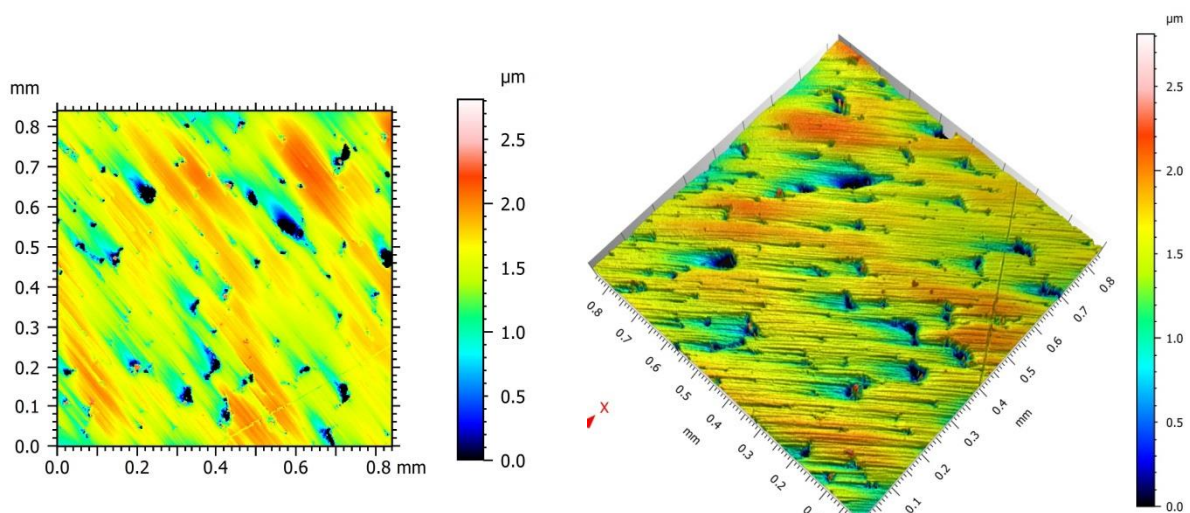


Figura 35: Imagem de perfilometria (objetiva de 20 X) mostrando aspecto da superfície de espécime do grupo DC 32xCIM.

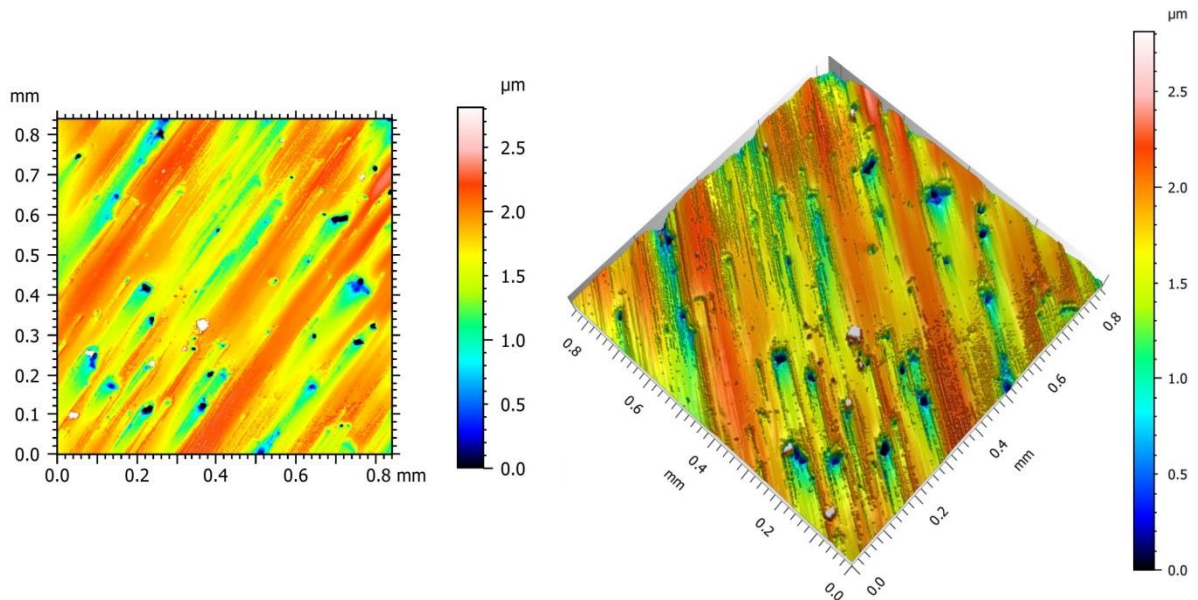
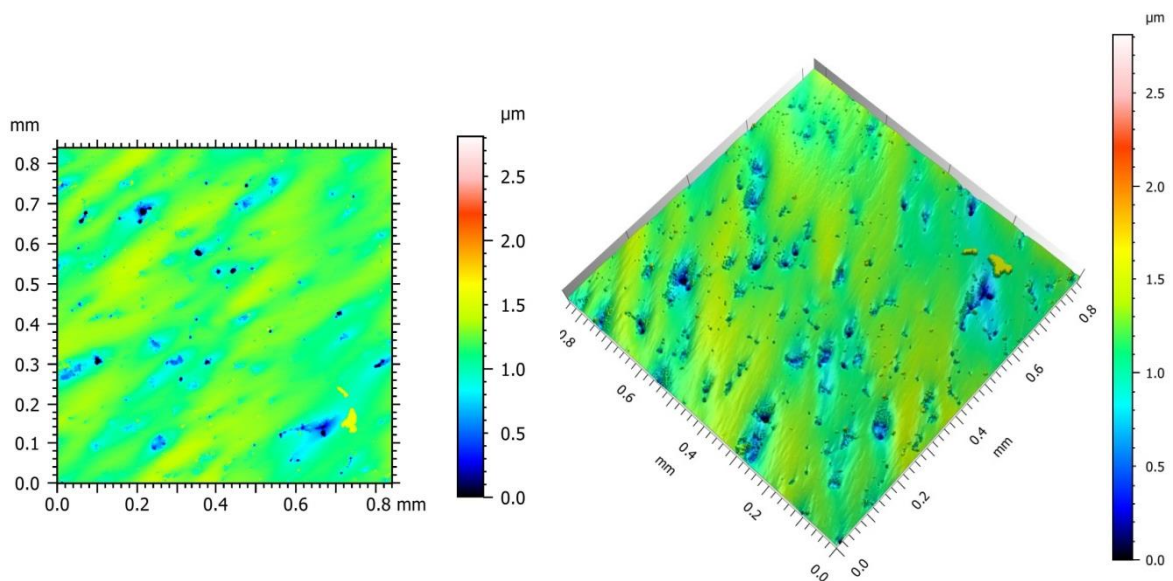


Figura 36: Imagem de perfilometria (objetiva de 20 X) mostrando aspecto da superfície de espécime do grupo DTC 32xCIM.



5.6 Dureza

A **Tabela 7** apresenta os valores da Média e Desvio-padrão da dureza Vickers (kg/mm^2) para os grupos Controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM e DTC 32xCIM. O maior valor de dureza foi encontrado no grupo Controle e esses valores decresceram nos grupos experimentais com diferença estatisticamente significativa. O DC 16xCIM apresentou valores de dureza intermediária, diferindo tanto do grupo controle quanto dos demais grupos.

Tabela 7: Valores da Média e Desvio-padrão (entre parênteses) da dureza Vickers (kg/mm^2) para os grupos controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM e DTC 32xCIM.

Letras maiúsculas idênticas nas colunas não diferenciam-se estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Grupos	Média (DP)
Controle	19,91 (0,44) A
DC 16xCIM	18,72 (2,05) B
DTC 16xCIM	16,77 (0,89) C
DC 32xCIM	16,30 (0,53) C
DTC 32xCIM	16,12 (0,53) C

5.7 Análise do ângulo de contato

O grupo DC 16xCIM apresentou o maior ângulo de contato, sem diferença estatisticamente significativa do Controle e do DTC 16xCIM, o qual não diferiu do DTC 32xCIM. O grupo DC 32xCIM apresentou o menor ângulo de contato (**Tabela 8**).

Tabela 8: Valores da Média e Desvio-padrão (entre parênteses) do ângulo de contato (°) para os grupos Controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM e DTC 32xCIM.

Letras maiúsculas idênticas nas colunas não diferenciam-se estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Grupos	Média (DP)
Controle	77,16 (5,61) A
DC 16xCIM	80,49 (4,14) A
DTC 16xCIM	74,08 (6,77) AB
DC 32xCIM	59,42 (13,01) C
DTC 32xCIM	66,13 (13,35) BC

5.8 Análise dos parâmetros de cor

O grupo controle apresentou o menor valor em todos os parâmetros L^* , a^* e b^* , com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. Para o parâmetro L^* , o maior valor encontrado foi do grupo DC 32xCIM; para os parâmetros a^* e b^* os maiores valores foram do grupo DTC 32xCIM (**Tabela 9**).

Tabela 9: Valores da Média e Desvio-padrão (entre parênteses) dos parâmetros L^* , a^* e b^* para os grupos Controle, DC 16xCIM, DTC 16xCIM, DC 32xCIM e DTC 32xCIM.

Letras maiúsculas idênticas nas colunas não diferenciam-se estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Grupos	L^*	a^*	b^*
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
Controle	56,29 (0,78) A	28,10 (1,27) A	28,16 (1,03) A
DC 16xCIM	63,22 (1,34) B	29,88 (0,85) B	32,05 (0,92) B
DTC 16xCIM	65,08 (1,06) C	32,15 (1,34) C	34,22 (1,10) C
DC 32xCIM	67,18 (1,68) D	33,55 (1,78) D	35,88 (2,13) D
DTC 32xCIM	65,22 (1,53) C	34,05 (1,15) D	36,57 (1,14) D

6. DISCUSSÃO

O poli(metil metacrilato) é amplamente utilizado na Odontologia especialmente para confecção de próteses dentárias removíveis, visto que apresenta diversas vantagens como biocompatibilidade, peso leve, capacidade de reproduzir forma, tamanho e cor dos tecidos orais, facilidade de manipulação, baixo custo e propriedades químicas e mecânicas aceitáveis (DHIR et al., 2007; GOIATO et al., 2016; HONG et al., 2009). No entanto, é constante a formação de poros e trincas neste material, o que favorece a adesão de micro-organismos. Este fato tem levado à incorporação de materiais ao PMMA na tentativa de melhorar as suas características químicas, mecânicas e biológicas (KARAAGACLIOGLU et al., 2008; LI et al., 2016; NAM; LEE; LEE, 2012; NAM, 2014).

Embora a incorporação de materiais ao PMMA já venha sendo realizada há alguns anos (EL-AASSAR et al., 2013; KONG; JANG, 2008; LI et al., 2016; NAM, 2014; SODAGAR et al., 2013), nenhum trabalho relatou a incorporação do nitrato de cério. Desta forma, a comparação dos presentes resultados com outros estudos tornou-se bastante difícil, sendo necessário compará-los a outros materiais.

A solução de nitrato de cério foi utilizada nesse estudo devido sua atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos ter sido relatada na literatura (COBRADO et al., 2012, 2013; SILVA-DIAS et al., 2015). Silva-Dias et al., (2015) observaram a eficácia do nitrato de cério contra diversas espécies de *Candida*, inclusive contra a mesma cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) utilizadas neste estudo, o que corrobora com os resultados encontrados. Quanto à atividade contra biofilmes de *C. albicans* pré-formados, o nitrato de cério também apresentou-se eficaz, visto que causou redução do biofilme entre 63% à 92% da biomassa total. No presente estudo, encontrou-se resultados semelhantes, visto que houve redução do biofilme de 74% a 93% para o grupo DMSO+Cério e de 94% a 100% para do grupo DMSO+Tween+Cério, ambos no período de 24 horas. No período de 48 horas houve redução de 75% a 96% para o grupo DMSO+Cério e de 62% a 98% para o grupo DMSO+Tween+Cério.

De acordo com Cobrado et al., (2012), o nitrato de cério inibiu o crescimento microbiano e reduziu a formação de biofilmes de *C. albicans* (ATCC 90028) e de cepas clínicas de *C. albicans*. As concentrações mais baixas de nitrato de cério utilizadas no estudo foram eficazes contra o biofilme de *C. albicans*. A concentração inibitória mínima contra cepas de *Candida albicans* ATCC 90028 apontada pelos autores foi de 2,6 mg/ml, bem superior aos valores encontrados no presente estudo (COBRADO et al., 2012). No entanto, a concentração da CIM foi menor que a da CFM (que possui efeito letal), diferente do presente estudo, em que as concentrações da CIM e CFM foram iguais, equivalentes a 1625 µg/mL. Esses dados podem ser bastante úteis em aplicações clínicas, pois a toxicidade dos lantanídeos é rara e possuem efeitos antimicrobianos bons.

As propriedades da superfície das resinas acrílicas são dependentes da hidrofobicidade, da energia livre de superfície e da rugosidade. Alguns autores relatam que a adesão de micro-organismos é mais propícia em superfícies mais rugosas (AL-BAKRI et al., 2014; MAYAHARA et al., 2014). Portanto, a rugosidade superficial é um dos fatores que está diretamente relacionado à formação de biofilmes nas próteses e consequente doenças na cavidade oral (MAYAHARA et al., 2014; PARANHOS et al., 2007).

Antes da análise rugosimétrica e dos demais testes de caracterização de superfície, todos os corpos-de-prova passaram pelo processo de acabamento e polimento, realizado para aplainá-los e remover possíveis falhas. Apesar de todas as amostras terem sido submetidas aos mesmos procedimentos, com o cuidado de se utilizar as lixas por intervalos de tempos iguais, mesma sequência de granulação das lixas d'água e mesmo operador, há prováveis situações que podem alterar a rugosidade da resina acrílica, tais como a variação da pressão aplicada sobre o espécime durante o acabamento e o próprio desgaste das lixas d'água de acordo com o uso. Portanto, é possível que dentro de um mesmo grupo e entre os grupos, ocorram diferenças nas rugosidades superficiais dos corpos-de-prova.

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura, foi possível observar de forma qualitativa que o grupo controle apresentou superfície menos rugosa quando comparada aos grupos testes. Houve também, um aparente aumento

da quantidade de poros e depressões conforme a concentração de cério aumentou, estando os grupos DC e DTC 32xCIM caracterizados por uma maior presença de defeitos de superfície. Entretanto, não foi possível avaliar se as depressões apresentadas pelos grupos experimentais foram o resultado de interações químicas entre os materiais (polimetilmetacrilato e nitrato de cério), possível ação dos solventes utilizados, do aquecimento e evaporação das soluções durante o processo de polimerização ou mesmo influenciada pelo processo de acabamento e polimento. Técnicas adicionais de caracterização química devem ser realizadas em estudos futuros para procurar estabelecer e aprimorar a compatibilização entre as soluções de nitrato de cério e o PMMA. As imagens corroboram os resultados de rugosidade apresentados através da perfilometria óptica, em que houve diferença estatisticamente significativa dos parâmetros Sa e Sz do grupo controle com todos os demais grupos.

Para avaliar a rugosidade das amostras do presente estudo, utilizou-se um perfilômetro óptico sem contato, equipamento que pode ser utilizado em diversos materiais, inclusive em superfícies macias e vulneráveis, visto que não contatam e não danificam o material, além de serem, geralmente, mais rápidos e apresentarem melhor resolução quando comparados aos instrumentos de contato mecânico (WENNERBERG; ALBREKTSSON; WENNERBERG A, 2000).

Além disso, optou-se por trabalhar com mensurações tridimensionais dos valores da rugosidade (Sa e Sz), os quais demonstram mais fielmente as características de uma superfície. O padrão de rugosidade Sa, representa a média aritmética dos valores absolutos dos desvios de superfície dentro da área de amostragem. Já o padrão Sz, representa o valor médio das alturas do pico mais elevado e do vale mais profundo dentro da área de amostragem. Este parâmetro é sensível às mudanças nas características topográficas acentuadas (QUEIROZ et al., 2013).

Quirynten, Bollen (1995), afirmaram que uma superfície rugosa pode provocar até três vezes mais adesão microbiana quando comparada com uma superfície lisa e polida. Através de seus estudos, afirmaram também que o limite aceitável de rugosidade (Ra) é de 0,2 μm , sendo este um valor que proporciona um acúmulo insignificante de biofilme. Embora tenha sido utilizado

nesse estudo um parâmetro tridimensional (S_a), para o qual não existem valores de referência na literatura, pode-se considerar que o grupo Controle apresentou valores de rugosidade (S_a) bem inferiores ao limite aceitável ($0,052 \mu\text{m}$), enquanto os demais grupos experimentais apresentaram ou valores de rugosidade ligeiramente inferiores (DTC 32xCIM= $0,187 \mu\text{m}$);), iguais (DTC 16xCIM= $0,199 \mu\text{m}$; DC 32xCIM= $0,202 \mu\text{m}$) ou ligeiramente superiores (DC 16xCIM= $0,224 \mu\text{m}$;) ao considerado aceitável. Valores de referência do parâmetro S_z também não foram encontrados na literatura, entretanto, os valores da rugosidade concordaram com aqueles encontrados no parâmetro S_a , com maiores valores no grupo DC 16xCIM ($2,34 \mu\text{m}$) e menores valores no grupo Controle ($0,51 \mu\text{m}$).

Pesquisas mostraram que a aderência de *C. albicans* à superfície das próteses também pode estar relacionada à rugosidade superficial (BERTOLINI et al., 2013; MAYAHARA et al., 2014; PARANHOS et al., 2007). All-Dwairi et al. (2012) observaram que as resinas acrílicas expostas a soluções de nistatina e fluconazol demonstraram um aumento na rugosidade superficial destes materiais. Além disso, foi observado um aumento significativo na adesão de *Candida* nos grupos expostos à nistatina e ao fluconazol. Sugeriram, portanto, que a interação destes agentes com as resinas acrílicas resulta em danos na superfície e pode, eventualmente, favorecer a colonização por microorganismos. Mayahara et al., (2014) observou que a adesão de *C. albicans* em superfícies ásperas foi de 2,2 vezes maior do que em superfícies lisas, o que acontece devido à penetração das estruturas fúngicas nos microporos das resinas. No entanto, os dados do presente estudo diferem do exposto por Mayahara et al., (2014) e All-Dwairi et al. (2012), tendo em vista que os valores de inibição de aderência de biofilme foram maiores em grupos com maiores rugosidades, como o DC 16xCIM e DC 32xCIM. Esses dados sugerem que outras propriedades estão diretamente relacionadas com a aderência de microorganismos a superfícies, tais como a hidrofobicidade e hidrofobicidade da superfície.

A molhabilidade é uma propriedade inversamente proporcional ao ângulo de contato; à medida que o ângulo de contato aumenta, a molhabilidade diminui e mais hidrofóbico torna-se o material. Alguns pesquisadores relatam

forte correlação entre a capacidade hidrofóbica dos materiais com o grau de colonização de micro-organismos na superfície do PMMA (AL-BAKRI et al., 2014; FREIRES et al., 2014; WADY et al., 2012), enquanto outros apontaram que não existe uma relação direta entre as duas propriedades (DE FOGGI et al., 2014). Ao investigar a capacidade de adesão de *Candida albicans* a uma resina modificada com ácido metacrílico, Park, Periathamby, Loza (2003) observaram que o ângulo de contato da superfície diminuiu significativamente à medida que a proporção de ácido metacrílico aumentou, tornando a resina acrílica mais hidrofílica. Conseqüentemente, houve maior redução da adesão de *Candida albicans*.

É possível observar que as diversas estruturas que revestem ou são incorporadas a materiais utilizados em próteses podem alterar de diferentes maneiras a hidrofobicidade destes. Azuma et al., (2012) verificaram que o revestimento de sílica em materiais de base de prótese provocou uma diminuição significativa do ângulo de contato, tornando-os mais hidrofílicos, o que pode ser um método eficaz para inibir a adesão inicial de *C. albicans*. Corroborando com esses resultados, encontrou-se que o grupo DC 32xCIM, o qual apresentou o menor valor do ângulo de contato, provocou maior inibição da adesão de *C. albicans*. Freires et al. (2014) afirmam que fatores abióticos como a hidrofobicidade superficial é um dos fatores que influenciam nos estágios iniciais de aderência de biofilme. Assim, a inibição da aderência de *Candida* spp pode apresentar-se como um fator importante para interromper os estágios iniciais de formação de biofilme.

Desta forma, pode-se sugerir que a hidrofiliabilidade do material pareceu estar mais relacionada com a inibição da adesão de biofilmes do que a rugosidade superficial destes, visto que o grupo que apresentou menor adesão de biofilme possui o menor ângulo de contato, porém, foi o segundo grupo com maior rugosidade. Salienta-se também que o fator do nitrato de cério ser um potente inibidor de biofilme de *Candida* spp. pode ter agido de forma sinérgica, ou até mesmo, ter sido o responsável pela redução da aderência do biofilme. Não se descarta também a possibilidade das soluções de DMSO e Tween, que são emulsificantes, e o próprio cério, agirem aumentando a molhabilidade do material. Como não se encontrou outros trabalhos que tenham feito a

incorporação do nitrato de cério ao PMMA, fica difícil estabelecer comparações. Entretanto, é interessante notar que, na associação em questão, a lógica de que uma superfície mais rugosa será sempre mais passível de colonização microbiana parece ter sido, pelo menos, questionada.

Os resultados concordam parcialmente com os obtidos por Foggi et al., (2014) que também não encontraram uma relação direta entre rugosidade superficial de uma resina acrílica com a colonização de *C. albicans* na superfície do material, porém afirmaram que não existiria uma relação entre hidrofobicidade e colonização de *C. albicans* na superfície do material.

Salienta-se que os autores em questão trabalharam com resina acrílica da mesma marca comercial da utilizada no presente trabalho, encontrando valores de ângulo de contato muito próximos entre a rugosidade simulada de 0,05 μm ($74,55^\circ$) e o grupo controle do estudo presente, com rugosidade também de 0,05 μm ($77,16^\circ$). Entretanto, para os grupos com rugosidade de 0,2 μm , os autores encontraram valores crescentes de ângulo de contato ($78,82^\circ$), enquanto que no presente estudo, os grupos experimentais, que apresentaram rugosidades S_a próximas de 0,2 μm , tiveram, especialmente nos grupos DC 32xCIM e DTC 32xCIM, ângulos de contato significativamente menores ($59,42^\circ$ e $66,13^\circ$, significativamente), o que parece reforçar ainda mais que as soluções testadas e o aumento da concentração do nitrato de cério influenciaram significativamente na molhabilidade do material, a despeito do aumento de rugosidade.

Em relação à dureza, esta é uma propriedade importante das resinas acrílicas, pois permite sua utilização na fabricação de próteses dentárias e está diretamente relacionada à resistência a forças oclusais, aos desgastes provocados pela limpeza mecânica e maior longevidade das próteses (AYAZ et al., 2014; STRAIOTO et al., 2010a, 2010b).

Durante o ciclo de polimerização das resinas acrílicas em micro-ondas, ocorre evaporação de uma parte do monômero devido às elevadas temperaturas as quais são submetidas e à reação exotérmica, processo este que provoca a formação de poros no interior do material (YANNIKAKIS et al., 2002). Para a confecção das resinas acrílicas dos grupos testes do presente estudo, soluções contendo água, nitrato de cério, DMSO e Tween foram

adicionadas em 20% do monômero, modificando a composição original do material e provocando, provavelmente, maior evaporação das soluções durante o ciclo de polimerização e, conseqüentemente, mais porosidades. Estas porosidades provocam alterações nas propriedades do material, deixando-as mais rugosas e susceptíveis ao desgaste. Dependendo das condições de polimerização, porosidades têm sido associadas com diminuição das propriedades mecânicas, da estética, pode apresentar-se como potencial reservatório de micro-organismos e retenção de fluidos (SINGH et al., 2013). Os resultados do presente estudo mostraram que houve uma redução significativa da dureza Vickers dos grupos testes em relação ao grupo controle, sendo a menor dureza referente ao grupo DTC 32xCIM. Essas diferenças em relação ao controle podem ser justificadas devido à incorporação das novas substâncias.

É importante ressaltar que, diferentemente da rugosidade e outras propriedades, do ponto de vista clínico, não existem parâmetros de dureza que sejam preconizados na literatura. Sendo assim, não é possível estimar qual seria o impacto dessa alteração do ponto de vista clínico.

Outra característica importante dos materiais protéticos são as características ópticas, reproduzidas nos parâmetros de cor, pois mudanças na coloração dos materiais podem reduzir sua aplicação, tendo em vista que podem comprometer os resultados estéticos dos tratamentos a serem realizados. Um sistema bastante utilizado para avaliar diferenças cromáticas na Odontologia é o sistema de cores da Commission International de l'Eclairage (CIE $L^*a^*b^*$), recomendada pela American Dental Association (ADA). Este sistema afirma que as cores da natureza são obtidas a partir da mistura de três cores básicas: vermelho, azul e verde (HONG et al., 2009). Os espaços de cores do sistema CIE $L^* a^* b^*$ podem especificar as cores em três escalas, sendo o L^* para representar a luminosidade (branco/preto), a^* para a coordenada vermelho/verde, b^* para a coordenada amarelo/azul (KOHLI; BHATIA, 2015; REN et al., 2015; WALDEMARIN et al., 2014). Os valores do espaço de cor $L^* a^* b^*$ podem ser positivos ou negativos, sendo os maiores valores positivos mais claro, vermelho e amarelo para as três escalas, respectivamente, e maiores valores negativos mais escuro, verde e azul.

Observou-se nos resultados do presente estudo que o grupo controle apresentou diferenças estatisticamente significantes de todos os outros grupos, com os menores valores nas escalas L*, a* e b*. Esta alteração de cor também foi visualmente perceptível (**Figura 18**), o que pode afetar a estética das próteses dentárias, tendo em vista que a incorporação do nitrato de cério resultou em uma resina mais clara, com espaços de cores mais vermelho e amarelo. No entanto, este fator pode ser minimizado através da adição de maior quantidade de pigmentos às resinas acrílicas. Os pigmentos são adicionados no polímero a fim de obter diferentes tonalidades e caracterizações para as próteses, dentre os quais, pode-se citar o sulfureto mercúrico, sulfeto de cádmio, seleneto de cádmio e óxido férrico. Portanto, seria possível contornar esse efeito indesejável com a adição de uma maior quantidade de pigmentos, buscando-se equalizar a cor com o material não incorporado (BOHRA et al., 2015). Dessa forma, pode-se manter as características adequadas para uso clínico do material.

Levando em consideração as propriedades avaliadas, pode-se sugerir que o grupo da resina acrílica incorporada por DMSO+Cério na concentração de 16xCIM seja o mais promissor para a utilização clínica, visto que apresentou o melhor resultado na inibição do biofilme e no ângulo de contato, quando comparado ao controle. Além disso, não apresentou diferença estatisticamente significativa dos demais grupos testes no ensaio de rugosidade (Sa). Quanto às alterações nos parâmetros de cor, alternativas podem ser utilizadas para aperfeiçoar esta propriedade, como já discutidas anteriormente.

Apesar dos resultados satisfatórios da presente pesquisa, ressaltamos que esta possui algumas limitações, visto que é uma pesquisa laboratorial não explorada anteriormente e necessita de validação do uso clínico na Odontologia para melhor comprovação dos resultados. Dificuldades de acesso a laboratórios e equipamentos também foram enfrentadas durante o seu desenvolvimento, o que resultou em menos informações a respeito das resinas acrílicas modificadas por nitrato de cério.

Desta forma, há a necessidade de novos estudos avaliando a incorporação de nitrato de cério em resinas acrílicas termopolimerizáveis para averiguar sua biocompatibilidade, compatibilidade química, estudar as

alterações da estrutura do PMMA e outras propriedades como a resistência à flexão, ao desgaste, e ao impacto; tendo em vista que foram obtidos resultados promissores em relação à inibição da aderência de biofilmes de *C. albicans*. Dessa forma, busca-se um possível material para futura utilização clínica no tratamento das infecções orais por *Candida* spp.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados, foi possível verificar que as soluções avaliadas apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans* tanto na forma planctônica quanto em biofilme, assim como houve redução da aderência de biofilme à resina acrílica modificada por nitrato de cério nos grupos DC 16xCIM e DC 32xCIM. No entanto, estas resinas experimentais apresentaram alterações em todas as propriedades avaliadas, com maiores valores de rugosidade e parâmetros *L a* e b* de cor, e menores valores de dureza e ângulo de contato.

REFERÊNCIAS

1. Al-Bakri I, Harty D, Al-Omari W, Swain M, Chrzanowski W, Ellakwa A. Surface characteristics and microbial adherence ability of modified polymethylmethacrylate by fluoridated glass fillers. *Aust Dent J*. 2014;59(4):482–9.
2. AL-Dwairi ZN, AL-Quran FA, AL-Omari OY. The effect of antifungal agents on surface properties of poly(methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. *J Prosthodont Res [Internet]*. Japan Prosthodontic Society; 2012;56(4):272–80.
3. Aujoulat F, Lebreton F, Romano S, Delage M, Marchandin H, Brabet M, et al. Comparative diffusion assay to assess efficacy of topical antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* in burns care. *Ann Clin Microbiol Antimicrob [Internet]*. BioMed Central Ltd; 2011;10(1):27.
4. Ayaz EA, Durkan R, Koroglu A, Bagis B. Comparative effect of different polymerization techniques on residual monomer and hardness properties of PMMA-based denture resins. *J Appl Biomater Funct Mater [Internet]*. 2014;12(3):228–33.
5. Azuma A, Akiba N, Minakuchi S. Hydrophilic surface modification of acrylic denture base material by silica coating and its influence on *candida albicans* adherence. *J Med Dent Sci*. 2012;59(1):1–7.
6. Bertolini MDME, Cavalcanti YW, Bordin D, Silva WJ Da, Cury AADB. *Candida albicans* biofilms and MMA surface treatment influence the adhesion of soft denture liners to PMMA resin. *Braz Oral Res [Internet]*. 2013;28(1):61–6.
7. Bohra PK, Ganesh PR, REDDY MM, EBENEZAR A, SIVAKUMAR G. Colour Stability of Heat and Cold Cure Acrylic Resins. *J Clin Diagnostic Res [Internet]*. 2015;9(1):10–3.
8. Botega DM, de Souza Machado T, de Mello JAN, Garcia RCMR, Del Bel Cury AA. Polymerization time for a microwave-cured acrylic resin with multiple flasks. *Braz Oral Res*. 2004;18(1):23–8.
9. Cavalcanti YW, Morse DJ, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Wei X, Wilson

- M, et al. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling*. 2015;31(1):27–38.
10. Choksi RH, Mody P V. Flexural properties and impact strength of denture base resins reinforced with micronized glass flakes. *J Indian Prosthodont Soc*. 2016;16(3):264–70.
 11. Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(5):1159–62.
 12. Cobrado L, Silva-Dias A, Azevedo MM, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. In vivo antibiofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(1):126–30.
 13. Dangi YS, Soni ML, Namdeo KP. Oral candidiasis: A review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2010;2(4):36–41.
 14. de Castro DT, Holtz RD, Alves OL, Watanabe E, Valente ML, da Silva CH, et al. Development of a novel resin with antimicrobial properties for dental application. *J Appl Oral Sci [Internet]*. 2014;22(5):442–9.
 15. de Foggi CC, Machado AL, Zamperini CA, Fernandes D, Wady AF, Vergani CE. Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. *J Investig Clin Dent [Internet]*. 2014;5:1–8.
 16. Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Andrew Dentino. Physical Properties of Denture Base Resins Potentially Resistant to *Candida* Adhesion. *J Prosthodont*. 2007;16(6):465–72.
 17. Djordjevic D. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol [Internet]*. 2002;68(6):2950–8. 50.
 18. El-Aassar MR, Hafez EE, Fouda MMG, Al-Deyab SS. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of poly(acrylonitrile-co-methyl methacrylate) with silver nanoparticles. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;171(3):643–54.
 19. Farias RMDC, Menezes RR, Oliveira JE, De Medeiros ES. Production of submicrometric fibers of mullite by solution blow spinning (SBS). *Mater Lett [Internet]*. Elsevier; 2015;149(3):47–9.

20. FERRACANE JL. *Materials in Dentistry-Principles and applications*. 2001.
21. Freires IDA, Murata RM, Furletti VF, Sartoratto A, De Alencar SM, Figueira GM, et al. *Coriandrum sativum L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on Candida spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression*. *PLoS One*. 2014;9(6).
22. Galvão LCDC, Furletti VF, Bersan SMF, Da Cunha MG, Ruiz ALTG, Carvalho JE De, et al. *Antimicrobial activity of essential oils against Streptococcus mutans and their antiproliferative effects*. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012.
23. Gantait S, Bhattacharyya J, Das S, Biswas S, Ghata A, Ghosh S, et al. *Comparative assessment of the effectiveness of different cleaning methods on the growth of Candida albicans over acrylic surface*. *Contemp Clin Dent [Internet]*. 2016;7(3):336.
24. Gendreau L, Loewy ZG. *Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis*. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251–60.
25. Goiato M, Zuccolotti BR, Moreno A, Vechiato Filho A, Paulini M, Santos DM. *Effect of nanoscale particles incorporation on microhardness of polymers for oral prosthesis*. *Contemp Clin Dent [Internet]*. 2016;7(3):307.
26. GOIATO MC, NÓBREGA AS, SANTOS DM dos, ANDREOTTI AM, Moreno A. *Effect of different solutions on color stability of acrylic resin-based dentures*. *Braz Oral Res*. 2014;28(1):1–7.
27. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. *Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin*. *J Prosthet Dent [Internet]*. The Editorial Council of the Journal of Prosthetic Dentistry; 2009;101(3):205–13.
28. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. *Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin*. *J Prosthet Dent*. 2009;101(3):205–13.
29. JAKUPEC MA, UNFRIED P, KEEPLER BK. *Pharmacological properties of cerium compounds*. 2005;153:101–11.
30. Karaagaciloglu L, Can G, Yilmaz B, Ayhan N, Semiz O, Levent H. *The*

- adherence of *Candida albicans* to acrylic resin reinforced with different fibers. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(2):959–63.
31. Kartika. The effect of microwave processing and use of antimicrobial agent on porosity of conventional heat cured denture base resin: An *in vitro* study. *J Indian Prosthodont Soc* [Internet]. 2015;15(3):257.
 32. Kasina SP, Ajaz T, Attili S, Surapaneni H, Cherukuri M, Srinath HP. To evaluate and compare the porosities in the acrylic mandibular denture bases processed by two different polymerization techniques, using two different brands of commercially available denture base resins - an *in vitro* study. *J Int oral Heal JIOH* [Internet]. 2014;6(1):72–7.
 33. Keyson D, Volanti DP, Cavalcante LS, Simões AZ, Varela JA, Longo E. CuO urchin-nanostructures synthesized from a domestic hydrothermal microwave method. *Mater Res Bull*. 2008;43(3):771–5.
 34. Kohli S, Bhatia S. Evaluation of the Color Durability of Acrylic Resin Veneer Materials after Immersion in Common Beverages at Different Time Intervals: A Spectrophotometric Study. *Biomed J*. 2015;38(3):244–9.
 35. Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir*. 2008;24(5):2051–6.
 36. Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology*. 2016;33(2):209–16.
 37. Liu IT, Hon MH, Teoh LG. Structure and optical properties of CeO₂ nanoparticles synthesized by precipitation. *J Electron Mater*. 2013;42(8):2536–41.
 38. Lyutakov O, Goncharova I, Rimpelova S, Kolarova K, Svanda J, Svorcik V. Silver release and antimicrobial properties of PMMA films doped with silver ions, nano-particles and complexes. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;49:534–40.
 39. Mayahara M, Kataoka R, Arimoto T, Tamaki Y, Yamaguchi N, Watanabe Y, et al. Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. *J Investig Clin Dent*.

- 2014;5(4):307–12.
40. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho ACR, Barbosa DB. Silver Distribution and Release from an Antimicrobial Denture Base Resin Containing Silver Colloidal Nanoparticles. *J Prosthodont*. 2012;21(1):7–15.
 41. Nam KY, Lee CH, Lee CJ. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. *Gerodontology*. 2012;29(2):413–9.
 42. Nam K-Y. Characterization and bacterial anti-adherent effect on modified PMMA denture acrylic resin containing platinum nanoparticles. *J Adv Prosthodont [Internet]*. 2014;6(3):207–14.
 43. Palmeira-De-Oliveira A, Gaspar C, Palmeira-De-Oliveira R, Silva-Dias A, Salgueiro L, Cavaleiro C, et al. The anti-Candida activity of *Thymbra capitata* essential oil: Effect upon pre-formed biofilm. *J Ethnopharmacol [Internet]*. Elsevier Ireland Ltd; 2012;140(2):379–83.
 44. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil*. 2007;34(8):606–12.
 45. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *J Prosthodont*. 2003;12(4):249–54.
 46. Queiroz JRC, Fissmer SF, Koga-Ito CY, Salvia A, Massi M, Sobrinho a SD, et al. Effect of Diamond-Like Carbon Thin Film Coated Acrylic Resin on *Candida albicans* Biofilm Formation. *J Prosthodont Esthet Reconstr Dent [Internet]*. 2013;22:451–5.
 47. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *Journal of clinical periodontology*. 1995. p. 1–14.
 48. Raj P a, Dentino AR. Denture polymers with antimicrobial properties: a review of the development and current status of anionic poly(methyl methacrylate) polymers. *Future Med Chem*. 2013;5(14):1635–45.
 49. Rameshbabu AP, Mohanty S, Bankoti K, Ghosh P, Dhara S. Effect of alumina, silk and ceria short fibers in reinforcement of Bis-GMA/TEGDMA dental resin. *Compos Part B Eng [Internet]*. Elsevier Ltd;

- 2015;70:238–46.
50. Ren J, Lin H, Huang Q, Zheng G. Determining color difference thresholds in denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent* [Internet]. Editorial Council for the Journal of
51. Sahin F, Güllüce M, Daferera D, Sökmen A, Sökmen M, Polissiou M, et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 2004;15(7):549–57.
52. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2).
53. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(PART1):10–24.
54. SB Brasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal Resultados Principais Brasília: Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção Básica, Ministério da Saúde. 2011.
55. Silva PMB Da, Acosta EJTR, Jacobina M, Pinto LDR, Porto VC. Effect of repeated immersion solution cycles on the color stability of denture tooth acrylic resins. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2011;19(6):623–7.
56. Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Cobrado L, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, et al. In vitro antifungal activity and in vivo antibiofilm activity of cerium nitrate against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(4):1083–93.
57. Sivakumar I, Arunachalam KS, Sajjan S, Ramaraju AV, Rao B, Kamaraj B. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resins: A research composition and update. *J Prosthodont*. 2014;23(4):284–90.
58. Sodagar A, Bahador A, Khalil S, Saffar Shahroudi A, Zaman Kassae M. The effect of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles on flexural strength of poly (methyl methacrylate) acrylic resins. *J Prosthodont Res* [Internet]; 2013;57(1):15–9.
59. Sodagar A, Kassae MZ, Akhavan A, Javadi N, Arab S, Kharazifard MJ.

- Effect of silver nano particles on flexural strength of acrylic resins. *J Prosthodont Res* [Internet]. Japan Prosthodontic Society; 2012;56(2):120–4.
60. Soll DR, Daniels KJ. Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2016;80(3):565–95.
61. Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*. 2007;18(5):409–13.
62. Straioto FG, Filho APR, Neto AJF, Cury AADB. Polytetrafluoroethylene added to acrylic resin: surface properties and *Candida albicans* adherence. *Am J Dent*. 2010;23(4):201–4.
63. Straioto FG, Ricomini Filho AP, Fernandes Neto AJ, del Bel Cury AA. Polytetrafluoroethylene added to acrylic resins: Mechanical properties. *Braz Dent J*. 2010;21(1):55–9.
64. Suresh Babu K, Anandkumar M, Tsai TY, Kao TH, Stephen Inbaraj B, Chen BH. Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):5515–31.
65. Trindade LA, de Araújo Oliveira J, de Castro RD, de Oliveira Lima E. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clin Oral Investig*. 2015;19(9):2223–31.
66. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol*. 2012;112(6):1163–72.
67. WALDEMARIN RF de A, CLEFF LB, SANTOS LG, CAMACHO GB, PINTO L de R. Color Variation of Acrylic Resins Immersed in Pigment Beverages According To the Consume Habits : a Pilot Study. 2014;
68. Wennerberg A, Albrektsson T, Wennerberg A AT. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(3):331–44.
69. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*. 2011;3–11.
70. Yannikakis S, Zissis A, Polyzois G, Andreopoulos A. Evaluation of

- porosity in microwave-processed acrylic resin using a photographic method. *J Prosthet Dent*. 2002;87(6):613–9.
71. Yano J, Yu A, Jr PLF, Noverr MC. Transcription Factors Efg1 and Bcr1 Regulate Biofilm Formation and Virulence during *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. *PLoS One*. 2016;11(7):1–19.
72. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2016;25(4):288–301.
73. Yu W, Wang X, Tang Q, Guo M, Zhao J. Reinforcement of denture base PMMA with ZrO₂ nanotubes. *J Mech Behav Biomed Mater [Internet]*. Elsevier; 2014;32:192–7.
74. Zhang K, Ren B, Zhou X, Xu H, Chen Y, Han Q, et al. Effect of Antimicrobial Denture Base Resin on Multi-Species Biofilm Formation. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2016;17(7):1033.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.