

BASES DE DENTADURA MODIFICADAS COM AGENTES ANTIFÚNGICOS COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE *CANDIDA ALBICANS*

JÚLIA SILVEIRA LONGARAY¹; RAFAEL GUERRA LUND²; ANDRESSA DA
SILVA BARBOZA³; MONIKA LAMAS FERREIRA⁴

¹Universidade federal de Pelotas– julias.longaray02@gmail.com

²Universidade federal de Pelotas– rafael.lund@gmail.com

³Universidade federal de Pelotas– andressahb@hotmail.com

⁴Universidade federal de Pelotas– monikalamasf@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A estomatite protética é uma condição crônica desencadeada por infecção fúngica por *Candida spp.*, resultando em inflamação na mucosa adjacente à base da prótese dentária (RODRIGUEZ-ARCHILLA et al., 2020), podendo afetar até 75% dos usuários de dentaduras e, assim, causar infecções quando o sistema imunológico está enfraquecido. Sabe-se que a *Candida spp.* forma biofilme na superfície das próteses, com destaque para a *Candida albicans* como a espécie mais comum associada à estomatite protética.

As próteses dentárias são geralmente feitas de polímeros sintéticos, como o polimetilmetacrilato (PMMA), que favorece a formação de biofilmes de *Candida spp.* devido à rugosidade de sua superfície, contribuindo para a alta prevalência de lesões de estomatite protética nessa área (FREITAS et al., 2022).

Recentemente, a tecnologia de impressão 3D tem sido explorada na fabricação de próteses dentárias, oferecendo vantagens em termos de complexidade geométrica e redução de desperdício de material. Além disso, a incorporação de antifúngicos em materiais protéticos tem sido investigada como uma abordagem promissora para o tratamento tópico da candidíase oral, com resultados positivos em estudos *in vitro* e *in vivo* (SELEEM et al., 2016).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o impacto desses agentes antifúngicos na atividade antibiofilme de uma resina de prótese dentária impressa em 3D para o tratamento de EP (estomatite protética).

2. METODOLOGIA

Fabricação das amostras de resina

Uma resina de impressão 3D para próteses dentárias (Cosmos Denture, Yller, Brasil) foi usada para preparar todas as amostras deste estudo. A resina não curada foi incorporada com fluconazol e nistatina em duas concentrações: 2mg/ml e 10mg/ml, e a resina sem nenhum agente antifúngico foi usada como controle, resultando em cinco grupos experimentais (FLU2, FLU10, NYS2, NYS10 e CONT). A resina líquida foi misturada com o pó dos agentes antifúngicos em sua concentração correspondente em um frasco de vidro com a ajuda de um agitador magnético a 800 RPM em um ambiente protegido da luz por 1 hora. Em seguida, a mistura foi colocada em um banho de ultrassom por 15 minutos para garantir que quaisquer grumos ou bolhas fossem eliminados. Os discos foram projetados no software Netfabb (Autodesk Inc., Califórnia, EUA) e impressos em uma impressora P30 RapidShape (Straumann, Suíça), uma impressora DLP (Digital Light

Processing), e depois foram imersos duas vezes em etanol 92,8% e curados sob luz UV por 10 minutos. Os discos tinham 12mm de diâmetro e 1mm de altura.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada conforme detalhado em outro lugar. *S. mutans* UA159 e *C. albicans* SC5314 foram usados para os experimentos de biofilme. As cepas foram armazenadas a -80°C em caldo de soja tripticase contendo 50% de glicerol. Ambas as cepas foram cultivadas até a fase média exponencial em caldo de coração e cérebro (BHI) (pH 5,5 para *C. albicans* e pH 7,0 para *S. mutans*).

Formação de Biofilme In Vitro

Um ensaio de biofilme interespecíes de dupla espécie foi realizado nos discos. *S. mutans* e *C. albicans* foram transferidos da cultura estoque para caldo de coração e cérebro (BHI) e incubados durante a noite a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, uma alíquota de cada cultura foi transferida para meio BHI fresco, crescida e monitorada por espectrofotometria até a fase média exponencial (densidade ótica de 1,0 e 0,8 a 600 nm, respectivamente). Os discos foram desinfetados, revestidos com saliva e suspensos verticalmente em placas de 24 poços, usando um aparato de disco. Cada disco foi inoculado com ~10⁶ células/ml de *S. mutans* e 10⁴ células/ml de *C. albicans*, em BHI com 1% de sacarose, a 37°C e 5% de CO₂, por 18 horas. Os discos foram transferidos para uma nova placa com meio fresco às 18 horas e às 28 horas, e o experimento foi concluído às 42 horas. No final, o biofilme foi coletado e sonificado, o número de células viáveis (UFC) foi determinado em placas de ágar sangue (BD BBL Prepared Plated Media: Trypticase Soy Agar (TSA II) with Sheep Blood, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e o peso seco foi calculado após a biomassa ter sido seca e pesada. O experimento foi conduzido em triplicata.

Análise de Biofilme por Microscopia Confocal

Um biofilme de 42 horas foi cultivado nos discos, como descrito anteriormente, e examinado usando microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Cepas de autofluorescência de *S. mutans* e *C. albicans* foram usadas nas mesmas condições. Cada poço foi preenchido com o inóculo e 13,4µl de Alexa Fluor 647-dextrano. O biofilme foi analisado em CLSM usando um microscópio confocal de fótons únicos de plataforma (LSM800, Zeiss, Jena, Alemanha) com um objetivo de água 20X (abertura numérica, 1.0). As imagens foram exportadas para o ImageJ para melhoria da imagem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da formação de biofilme revelaram um efeito significativo do fluconazol no biofilme. Na concentração de 10mg/ml, o fluconazol reduziu significativamente as unidades formadoras de colônias (CFU) de *C. albicans* em comparação com o grupo de controle, bem como uma diminuição no peso seco total, que inclui células não viáveis e outros produtos do biofilme. Por outro lado, a nistatina não mostrou diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas. As imagens de microscopia confocal fornecem uma representação visual dos resultados quantitativos. No grupo de controle, as imagens mostram uma grande quantidade de polissacarídeo extracelular (EPS) em vermelho, permeando

um grande número de colônias de *S. mutans* (verde), que estão distribuídas pela superfície. As hifas e as células de levedura de *C. albicans* (ciano) podem ser observadas em toda a imagem. Na imagem do fluconazol, existem colônias maiores, mas menos colônias de *S. mutans* ligadas à superfície. O EPS está principalmente localizado na superfície, e há muito poucas células de levedura de *C. albicans* visíveis. Na imagem da nistatina, um padrão semelhante de colônias de *S. mutans* é observado, mas há mais células de levedura de *C. albicans* visíveis e hifas pequenas e esparsas. Esses resultados de avaliação antibiofilme obtidos por microscopia confocal demonstram a interrupção da arquitetura do biofilme, revelando a eficácia da nistatina e do fluconazol, especialmente contra espécies fúngicas. Após a liberação de 72 horas em água e testes de escovação artificial, a atividade antifúngica das amostras foi testada novamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos em termos de formação de biofilme. No entanto, em termos de atividade antibiofilme dos discos enxertados, tanto o fluconazol quanto a nistatina reduziram significativamente as UFC de *C. albicans* em comparação com o grupo de controle.

Estudos demonstraram susceptibilidade de 98,7% (MARCOS-ARIAS et al., 2012) e 99,4% (MIHRET et al., 2020) em espécies de *Candida*, o caracterizando com uma excelente atividade *in vitro* e potencialmente como alternativa no tratamento de candidíase.

Portanto, foram avaliados os resultados dos testes feitos nas bases de prótese dentária contendo antifúngicos para candidíase.

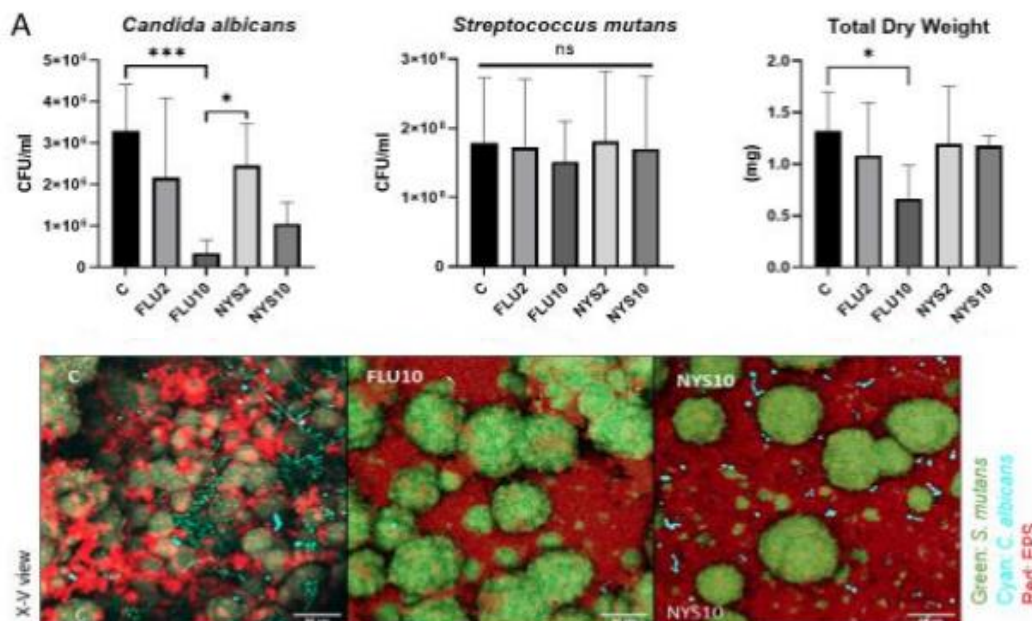


Figura 1. Ensaio de formação de biofilme resultados em UFC/ml de *C. albicans* e *S. mutans*, peso seco total e imagens confocais de biofilme em discos incorporados com antifúngicos.

4. CONCLUSÕES

A adição de antifúngicos a uma resina de impressão 3D para próteses dentárias demonstrou eficácia no combate a biofilmes, inibindo a aderência de *C. albicans*. Entretanto, observou-se uma redução na eficácia antifúngica após testes

de envelhecimento e desgaste da resina. Esses resultados são promissores, sugerindo que materiais dentários com propriedades antifúngicas têm potencial para controlar o crescimento microbiano em próteses dentárias. No entanto, estudos clínicos são necessários para validar seu desempenho em contextos reais, e outras propriedades, como resistência e biocompatibilidade, também precisam ser investigadas. Em resumo, essas descobertas apontam para avanços na qualidade de vida dos pacientes que usam próteses dentárias, mas exigem pesquisas adicionais para sua validação e compreensão completa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FREITAS, R.F.C.P. et al. Physical, Mechanical, and Anti- Biofilm Formation Properties of CAD- CAM Milled or 3D Printed Denture Base Resins: In Vitro Analysis. **Journal of Prosthodontics**, v. 32, n. S1, p. 38-44, 2023.

MARCOS-ARIAS, C.; MARICHALARMENDIA, X.; ERASO, E.; ECHEBARRIA-GOICOURIA, M. A.; AGUIRRE-URIZAR, J. M.; QUINDOS, G. In vitro antifungal susceptibility of oral Candida isolates from patients suffering from caries and chronic periodontitis. **Mycopathologia**, v. 182, n. 5-6, p. 471-485, 2017.

MIHRET, A. Distribution of Candida albicans and nonalbicans Candida species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal susceptibility profile in Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

RODRIGUEZ-ARCHILLA, A.; GARCIA-GALAN, C. Etiological factors related to denture stomatitis: A meta-analysis. **Dentistry and Medical Research**, v. 8, n. 2, p. 37-42, 2020.

SELEEM, D. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of lichochalcone-A against Candida albicans biofilms. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157188, 2016.