

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

ADELAIDA SÁNCHEZ ALIAGA

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS SOBRE A
MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE E A LIBERAÇÃO IN VITRO DE MATERIAIS
MACIOS TEMPORÁRIOS PARA BASE DE PRÓTESE**

PONTA GROSSA

2014

ADELAIDA SÁNCHEZ ALIAGA

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS SOBRE A
MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE E A LIBERAÇÃO IN VITRO DE MATERIAIS
MACIOS TEMPORÁRIOS PARA BASE DE PRÓTESE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Aliaga, Adelaida Sánchez
A398 Efeito da incorporação de fármacos
antifúngicos sobre a morfologia de
superfície e a liberação in vitro de
materiais macios temporários para base de
prótese/ Adelaida Sánchez Aliaga. Ponta
Grossa, 2014.
135f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia -
Área de Concentração: Clínica Integrada),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Prof^a Dr^a Vanessa
Migliorini Urban.
Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

1.Estomatite sob Prótese.
2.Reembasadores de Dentadura.
3.Anti-Infecciosos. 4.Microscopia
Eletrônica de Varredura. 5.Microscopia
Confocal. I.Urban, Vanessa Migliorini.
II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em

CDD: 617.6

ADELAIDA SÁNCHEZ ALIAGA

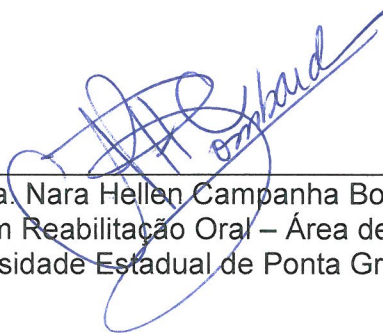
**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS SOBRE A
MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE E A LIBERAÇÃO IN VITRO DE MATERIAIS
MACIOS TEMPORÁRIOS PARA BASE DE PRÓTESE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Ponta Grossa, 21 de fevereiro de 2014.



Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban – Orientadora
Doutora em Reabilitação Oral – Área de Prótese
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda
Doutora em Reabilitação Oral – Área de Prótese
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek
Doutora em Reabilitação Oral – Área de Prótese
Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Bauru

DADOS CURRICULARES

Adelaida Sánchez Aliaga

NASCIMENTO	03.09.1977	Lima – Peru
FILIAÇÃO		Adelaida Aliaga Chávez Mauro Jorge Sánchez Velásquez
	1996-2000	Curso de Graduação em Estomatologia da Universidade Peruana Cayetano Heredia (UPCH) Lima - Peru
	2012-2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) Nível de Mestrado, Área de Concentração em Clínica Integrada, Linha de Pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais
	2013-2014	Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia - Fases cirúrgica e protética da Associação Brasileira de Odontologia – Seção Paraná (ABO-PR)
	2013-2014	Associação à ABO-PR
	2013-2014	Associação à Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO)

Dedicatória

A *Deus*, por ter me carregado sempre nas mãos e nunca abandonado.

“Grande coisa é haver recebido do céu uma partícula da sabedoria, o dom de achar as relações das coisas, a faculdade de as comparar e o talento de concluir!”

Machado de Assis

Aos meus pais *Adelaida* e *Jorge*, pela vida, por terem me ensinado que tudo se consegue com esforço e sacrifício, por terem sempre a palavra certa para meu espírito, pelo colo, o abraço e o beijo a cada instante, por acompanharem meus passos e me acalmarem nas dificuldades. Amo muito!

“Quem ama extremamente, deixa de viver em si e vive no que ama.”

Platão

Aos meus irmãos *Marlene*, *Sixtina*, *Jorge*, por todos os momentos fraternos, pelo apoio e amor. Adoro vocês!

“Eu gosto de olhos que sorriem, de gestos que se desculpam, de toques que sabem conversar e de silêncios que se declaram.”

Machado de Assis

À memória do meu avô *Demóstenes*.

“A vida não passa de uma oportunidade de encontro; só depois da morte se dá a junção; os corpos apenas têm o abraço, as almas têm o enlace.”

Victor Hugo

À minha avó *Sixtina*, pelo carinho, pela cumplicidade e pelo exemplo de mãe.

Dedico este trabalho

*“Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me dio dos luceros que cuando los abro
Perfecto distingo lo negro del blanco
Y en el alto cielo su fondo estrellado
Y en las multitudes el hombre que yo amo.”*

Parte da canção "Gracias a la vida" da compositora chilena Violeta Parra

Agradecimentos especiais

À minha orientadora *Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban*, pela paciência, dedicação e tolerância, pela orientação minuciosa e detalhada desta Dissertação, por me ensinar que a paciência e a perseverança são fundamentais. A sua competência, como professora e pesquisadora, serve-me como exemplo e estímulo. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao meu co-orientador *Prof. Dr. Paulo Vitor Farago*, pela disponibilidade para responder minhas dúvidas, recebendo-me com carinho e nunca medindo esforços para me ouvir, por me contagiar a paixão pelas coisas, pela valiosa contribuição científica no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo carinho e amizade.

Minha gratidão

Agradecimentos

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, ao Secretário da Ciência, Tecnologia e do Ensino Superior do Paraná **Prof. Dr. João Carlos Gomes** e à Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPG **Profa. Dra. Osnara Maria Mongruel Gomes**, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Aos Professores da Pós-Graduação em Odontologia da UEPG **Prof. Dr. Abraham Lincoln Calixto**, **Prof. Dr. Benjamin de Melo Carvalho**, **Profa. Dra. Denise Stadler Wambier**, **Prof. Dr. Carlos Roberto Berger**, **Prof. Dr. Fabio André dos Santos**, **Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti**, **Profa. Maiza Taques Margraf Althaus**, **Profa. Denise Puglia Zanon**, **Profa. Dra. Márcia Helena Baldani Pinto**, **Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda**, **Profa. Dra. Stella Kossatz Pereira**, **Prof. Dr. Ulisses Coelho**, **Prof. Dr. Vitoldo Antônio Kozlowski Júnior**, **Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguércio**, **Profa. Dra. Alessandra Reis Silva Loguércio**, **Profa. Dra. Elizabete Brasil dos Santos**, pelos ensinamentos, conselhos, orientações, sugestões e carinho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo suporte financeiro concedido na forma de Bolsa de Mestrado durante todo o transcorrer do Curso.

À **Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek**, por disponibilizar materiais e recursos adquiridos com seu Auxílio Regular à Pesquisa obtido pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, permitindo que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao **Dr. Milton Domingos Michél** e ao **Sr. Alex F. Coleti**, pelo auxílio nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal Laser, respectivamente.

Ao **Prof. Dr. Egon Schnitzler**, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos em análises térmicas.

Aos funcionários **Morgana das Graças Procz dos Santos**, **Luiz Roberto Cantori** e **Elizabete Munhoz**.

Às minhas queridas amigas **Fabiana Madalozzo Coppla** e **Paola Zurita Bayá**, pela amizade e carinho, pelos momentos de felicidade, pelas conversas, por se importarem comigo e serem o conforto para a saudade. Vocês sempre estarão no meu coração.

“Um amigo é aquele que sabe a canção de seu coração e pode cantá-la quando você tiver esquecido a letra.”

Julio Ramón Ribeyro

Aos meus queridos amigos do Mestrado **Sibelli Parreiras**, **Juliana Schaia**, **Fabiana Siqueira**, **Juliana de Geus**, **Letícia Antonelo**, **Letícia Wambier**, **Gisele Dias**, **Thaynara Boing**, **Johanna Sánchez**, **Anna Szesz**, **Andrés Montenegro**, **Andrés Millán**, **Camilo Pulido** e **Andrés Dávila**, pela amizade, pelas risadas e pela parceria.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Sánchez-Aliaga, A. **Efeito da incorporação de fármacos antifúngicos sobre a morfologia de superfície e a liberação in vitro de materiais macios temporários para base de prótese** [Dissertação] Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2014.

RESUMO

Objetivo: A proposta deste estudo foi avaliar a morfologia e a rugosidade de superfície e a liberação in vitro de materiais macios temporários com incorporação de fármacos antifúngicos, comumente utilizados para o tratamento da estomatite protética, em suas concentrações mínimas inibitórias (CMI) ao biofilme de *Candida albicans*. **Material e métodos:** As análises de superfície do condicionador de tecido Softone (S) e do reembasador resiliente Trusoft (T) tanto controles como modificados pela incorporação de nistatina (Ni), miconazol (Mc), cetozonazol (Ce), diacetato de clorexidina (Clx) e itraconazol (It) foram feitas por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal laser. A liberação in vitro dos fármacos Ni e Clx foi quantificada utilizando espectrofotometria na região do Ultravioleta visível. Análises adicionais dos materiais contendo Ni e Clx foram feitas utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os antifúngicos foram incorporados em suas CMI ao biofilme de *C. albicans* determinadas em estudo prévio (Ni = 0,032 g; Mc = 0,256 g; Ce = 0,128 g; Clx = 0,064 g e It = 0,256 g/g do material). Os corpos de prova foram armazenados em água destilada a 37°C por até 14 dias previamente às análises. **Resultados:** O Softone apresentou morfologia mais irregular que o Trusoft. Foi notada alteração de superfície em ambos os materiais, principalmente naqueles contendo fármacos, com o aumento do tempo de imersão. Os maiores e os menores tamanhos de partículas foram dos fármacos Clx e It e Ni e Ce, respectivamente. Os grupos contendo Clx e It demonstraram superfícies extremamente porosas e irregulares. Os espécimes modificados apresentaram valores superiores de rugosidade média (Ra) em relação aos controles. Houve uma tendência de aumento de Ra após 7 dias, seguida por uma diminuição a valores inferiores aos iniciais após 14 dias para o grupo controle e aqueles contendo Ni, Mc e Ce. Ambos os materiais apresentaram cinética de liberação biexponencial: rápida liberação inicial seguida por uma liberação mais lenta. O Softone liberou maior concentração dos fármacos que o Trusoft e a clorexidina foi liberada em maior quantidade que a nistatina. As análises em DSC revelaram Tg mais baixa para o Softone e que a temperatura de fusão dos fármacos pouco alterou após terem sido incorporados aos materiais. **Conclusão:** A incorporação de Clx ou It alterou mais significativamente a superfície dos materiais. O Softone foi capaz de liberar maior concentração dos fármacos Clx e Ni detectada uma fraca ligação química entre estes fármacos e os materiais avaliados.

Palavras-chave*: Estomatite sob Prótese. Reembasadores de Dentadura. Anti-Infecciosos. Microscopia Eletrônica de Varredura. Microscopia Confocal. Espectrofotometria Ultravioleta. Calorimetria Diferencial de Varredura.

* Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

Sánchez-Aliaga, A. **Effect of the addition of antifungals on the surface morphology and the in vitro leaching from temporary soft denture materials** [Dissertação] Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2014.

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the surface morphology and roughness and the in vitro leachability of temporary soft liners modified by the incorporation of antifungals, generally used for the denture stomatitis treatment, in their minimum inhibitory concentrations (MIC) for the biofilm of *Candida albicans*. **Material and methods:** The surface analyses of the tissue conditioner Softone (S) and the resilient liner Trusoft (T) modified or not by the addition of nystatin (Ny), miconazole (Mc), ketoconazole (Ke), chlorhexidine diacetate (Chx), and itraconazole (It) were made by using scanning electron microscopy and confocal laser microscopy. In vitro leachability of Ny and Chx was measured using Ultraviolet visible spectroscopy. Additional analyses of the modified materials containing Ny and Chx were made using differential scanning calorimetry (DSC). The antifungals were incorporated at their previously determined MIC for the biofilm of *C. albicans* (Ny = 0.032 g; Mc = 0.256 g; Ke = 0.128 g; Chx = 0.064 g; and It = 0.256 g/g of material). The specimens were stored in distilled water at 37°C for up to 14 days previously to the analyses. **Results:** Softone had more irregular surface morphology than Trusoft did. Morphological changes were noted in both materials with increasing immersion time, particularly in those containing drugs. Ny and Ke showed the smallest particle sizes, while Chx and It showed the largest ones. Groups containing Chx and It presented extremely porous and irregular surface. Modified specimens had superior roughness (Ra) values in comparison with the control specimens. There was a trend towards an increase in Ra parameter after 7 days, followed by a decrease to values lower than the initial ones after 14 days, in the control and specimens with Ny, Mc, and Ke. Both materials had biexponential kinetics of release: a rapid initial release followed by a slower leaching. Softone leached more concentration of the antifungals than Trusoft and chlorhexidine was released at higher concentration than nystatin. DSC analysis revealed low Tg for Softone and that the fusion temperature of the drugs changed little after they had been added to the materials. **Conclusion:** The addition of Chx or It changed more significantly the surface of the materials. Softone was able to release more drug concentration and it was noted a weak chemical bond between the drugs and the evaluated materials.

Keywords*: Denture Stomatitis. Denture Liners. Anti-Infective Agents. Scanning Electron Microscopy. Confocal Microscopy. Ultraviolet Spectrophotometry. Differential Scanning Calorimetry.

* Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- Confeção dos corpos de prova para as análises de superfície. A – Matriz metálica; B – Adição do pó dos fármacos ao pó do material macio; C – Posicionamento das matrizes; D – Inserção do material modificado no interior das matrizes entre duas placas de vidro; E – Remoção do corpo de prova do interior da matriz; F – Corpos de prova finalizados.....	74
FIGURA 2	- Processo de metalização e análise das amostras em MEV. A – Fixação das amostras em <i>stub</i> metálico; B – Metalizador; C e D - Amostras após metalização; E – Amostras posicionadas no porta <i>stub</i> da câmara de vácuo; F – MEV.....	76
FIGURA 3	- Análise das amostras em microscopia confocal laser. A – Microscópio confocal laser; B e C – Posicionamento e análise das amostras.....	78
FIGURA 4	- Quantificação das soluções analíticas de Clx para a elaboração da curva de calibração. A - Espectrofotômetro UV-Vis; B – Solução colocada na cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico; C – Cubeta colocada no espectrofotômetro para análise a 480 nm; D – Diferentes concentrações das soluções analíticas de Clx para a curva de calibração.....	80
FIGURA 5	- Preparo das soluções analíticas de Ni para a elaboração da curva de calibração. A – Balões em aquecimento em banho maria em ebulição sob agitação constante; B – Mudança da cor de transparente para amarela após o aquecimento; C – Resfriamento dos balões em água gelada; D – Mudança gradual da cor para rosa após a adição de ácido clorídrico; E - Diferentes concentrações das soluções analíticas de Ni para a curva de calibração.....	82

FIGURA 6	- Matrizes metálicas para confecção dos corpos de prova das análises de liberação.....	84
FIGURA 7	- Confecção dos corpos de prova para as análises de liberação. A – Matriz metálica posicionada sobre a placa de vidro; B – Inserção do material modificado no interior da matriz entre duas placas de vidro; C – Corpo de prova removido da matriz; D – Armazenamento do corpo de prova em água destilada.....	85
FIGURA 8	- Análise térmica em calorimetria exploratória diferencial. A – Equipamento DSC; B – Cadinhos de alumínio dentro do forno; C – Forno do equipamento contendo os cadinhos referência e com a amostra.....	88
FIGURA 9	- Imagens em MEV das partículas dos fármacos avaliados neste estudo. A e B – Ni; C e D – Mc; E e F – Ce; G e H – Clx e I e J – It.....	91
FIGURA 10	- Imagens em MEV do condicionador de tecido Softone após 24 h (1ª coluna), 7 dias (2ª coluna) e 14 dias (3ª coluna). A a C – controle; D a F – Ni-S; G a I – Mc-S; J a L – Ce-S; M a O – Clx-S e P a R – It-S.....	93
FIGURA 11	- Imagens em MEV do reembasador resiliente Trusoft após 24 h (1ª coluna), 7 dias (2ª coluna) e 14 dias (3ª coluna). A a C – controle; D a F – Ni-T; G a I – Mc-T; J a L – Ce-T; M a O – Clx-T e P a R – It-T.....	94
FIGURA 12	- Imagens em microscopia confocal laser do condicionador de tecido Softone após 24 h (1ª coluna), 7 dias (2ª coluna) e 14 dias (3ª coluna). A a C – controle; D a F – Ni-S; G a I – Mc-S; J a L – Ce-S; M a O – Clx-S e P a R – It-S.....	96
FIGURA 13	- Imagens em microscopia confocal laser do reembasador resiliente Trusoft após 24 h (1ª coluna), 7 dias (2ª coluna) e 14 dias (3ª coluna). A a C – controle; D a F – Ni-T; G a I – Mc-T; J a L – Ce-T; M a O – Clx-T e P a R – It-T.....	97
FIGURA 14	- Valores de rugosidade média (Ra) obtidos para os materiais Softone e Trusoft em todos os grupos experimentais.....	100

FIGURA 15	- Representação gráfica da curva analítica padrão para a quantificação de Clx obtida por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 480$ nm).....	102
FIGURA 16	- Perfil de liberação in vitro de Clx a partir de ambos os materiais durante 14 dias.....	103
FIGURA 17	- Representação gráfica da curva analítica padrão para a quantificação de Ni obtida por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 520$ nm).....	104
FIGURA 18	- Perfil de liberação in vitro de Ni a partir de ambos os materiais durante 14 dias.....	105
FIGURA 19	- Curvas de DSC dos materiais macios temporários Softone e Trusoft.....	106
FIGURA 20	- Curvas de DSC do fármaco Clx, dos materiais macios sem e com a adição de Clx.....	107
FIGURA 21	- Curvas de DSC do fármaco Ni, dos materiais macios sem e com a adição de Ni.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	. Materiais macios temporários selecionados.....	71
Tabela 2	. Fármacos antifúngicos selecionados e suas CMI ao biofilme de <i>C. albicans</i> utilizadas.....	72
Tabela 3	. Soluções analíticas para preparo da curva de calibração de Clx.	79
Tabela 4	. Soluções analíticas para preparo da curva de calibração de Ni...	81
Tabela 5	. Modelagem matemática pela equação biexponencial para ambos os materiais contendo Clx.....	103
Tabela 6	. Modelagem matemática pela equação biexponencial para ambos os materiais contendo Ni.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABO-PR	Associação Brasileira de Odontologia – Seção Paraná
ACS	American Chemical Society
ADA	American Dental Association
ATCC	American Type Culture Collection
C.	<i>Candida</i>
CA	Califórnia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Ce (Ke)	Cetoconazol (Ketoconazole)
Ce-S (Ke-S)	Material Softone modificado pela incorporação de cetoconazol
Ce-T (Ke-T)	Material Trusoft modificado pela incorporação de cetoconazol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Clx (Chx)	Diacetato de clorexidina (Chlorhexidine diacetate)
Clx-S (Chx-S)	Material Softone modificado pela incorporação de diacetato de clorexidina
Clx-T (Chx-T)	Material Trusoft modificado pela incorporação de diacetato de clorexidina
CMI	Concentração mínima inibitória
DE	Delaware
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (Differential Scanning Calorimetry)
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
IL	Illinois
It	Itraconazol (Itraconazole)
It-S	Material Softone modificado pela incorporação de itraconazol
It-T	Material Trusoft modificado pela incorporação de itraconazol
ISO	International Standardization for Organization

Ltda.	Limitada
Mc	Miconazol (Miconazole)
Mc-S	Material Softone modificado pela incorporação de miconazol
Mc-T	Material Trusoft modificado pela incorporação de miconazol
MEV (SEM)	Microscopia Eletrônica de Varredura (Scanning Electron Microscopy)
MO	Missouri
MSC	Critério de Seleção de Modelo (Model Selection Criterion)
MSDS	Dados de Segurança do Material (Material Safety Data Sheet)
NCYC	National Collection of Yeast Cultures
Ni (Ny)	Nistatina (Nystatin)
Ni-S (Ny-S)	Material Softone modificado pela incorporação de nistatina
Ni-T (Ny-T)	Material Trusoft modificado pela incorporação de nistatina
NY	Nova Iorque (New York)
P.A.	Pró-análise
PEMA	Polietil metacrilato
PR	Paraná
Prof.	Professor
Profa.	Professora
RJ	Rio de Janeiro
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RS	Rio Grande do Sul
S	Softone
S.	<i>Staphylococcus ou Streptococcus</i>
SBPqO	Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
SP	São Paulo
spp.	Espécie
T	Trusoft
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UPCH	Universidade Peruana Cayetano Heredia
UV-Vis	Ultravioleta visível (Ultraviolet visible)
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose

XTT (2,3-Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl) -5- [(Phenyl-
Amino)Carbonyl] - 2H-Tetrazolium Hydroxide

LISTA DE SÍMBOLOS

.	Veze
-	a/menos
>	Maior
+	Mais
±	mais ou menos
<	Menor
%	porcentagem/porcento
/ ou :	ou/e/dividido por
=	Igual
≈	Aproximadamente
®	marca registrada
λ	comprimento de onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μm ²	micrometros quadrados
atm	Atmosfera
bar	bar (unidade de pressão)
CIE L*a*b*	Commission Internationale d'Eclairage; "L", "a" e "b": dimensões da cor
cm	Centímetro
CO ₂	dióxido de carbono
e	função exponencial
f	Folhas
g	Gramma
h	Hora
H ₂ O	Água
Kg	Kilograma
KV	Kilovoltagem
L	Litro
LD50	dose letal média

M	massa molar
mAbs	Miliabsorvância
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	Megapascal
n	número amostral por grupo experimental
N	parâmetro de Korsmeyer-Peppas
N	normal/Newton
NBS	National Bureau Standards
N-H	grupos funcionais aminas
nm	Nanometro
nmol	Nanomol
n°	Número
°C	grau Celsius
O-H	grupos funcionais álcoois ou fenois
pH	potencial hidrogeniônico
r	coeficiente de correlação linear
Ra	rugosidade média
rpm	rotações por minuto
s	Segundo
Tg	temperatura de transição vítrea
™	marca registrada (trademark)
u	unidade de massa atômica
UI	unidades internacionais
x	por/vezes/coordenada horizontal no plano cartesiano
y	coordenada vertical no plano cartesiano
cm ⁻¹	número de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO	27
2.2	LIBERAÇÃO IN VITRO	44
2.3	PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS	53
3	OBJETIVOS	67
3.1	OBJETIVO GERAL	67
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
3.3	HIPÓTESES TESTADAS	68
4	MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1	LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	69
4.2	MATERIAIS	72
4.3	ANÁLISES DE SUPERFÍCIE	73
4.3.1	Confecção dos corpos de prova	73
4.3.2	Microscopia eletrônica de varredura	75
4.3.3	Microscopia confocal laser para análise de superfície	77
4.4	LIBERAÇÃO IN VITRO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis	78
4.4.1	Preparo das soluções padrão e validação da metodologia para Clx	78
4.4.2	Preparo das soluções padrão e validação da metodologia para Ni	81
4.4.3	Confecção dos corpos de prova	83
4.4.4	Quantificação dos fármacos liberados a partir dos materiais macios	86
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA FÁRMACO-MATRIZ POR DSC	88
5	RESULTADOS	90
5.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	90
5.2	MICROSCOPIA CONFOCAL LASER PARA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE	95
5.3	LIBERAÇÃO IN VITRO	101
5.3.1	Diacetato de clorexidina	101
5.3.2	Nistatina	103
5.4	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL	105

6	DISCUSSÃO.....	109
6.1	ANÁLISE DE SUPERFÍCIE.....	109
6.2	LIBERAÇÃO IN VITRO.....	114
7	CONCLUSÕES.....	121
	REFERÊNCIAS.....	122
	APÊNDICE A – Preparo de reagentes.....	133

1 INTRODUÇÃO

A infecção da cavidade bucal por *Candida* spp., denominada candidose bucal, é considerada a infecção fúngica mais comum entre humanos, principalmente em idosos e usuários de próteses totais.¹ A candidose bucal relacionada à utilização de próteses removíveis, parciais ou totais, é denominada estomatite protética e é considerada a lesão mais frequente entre os usuários dessas próteses.^{2,3} Apesar de a etiologia da estomatite protética ser considerada multifatorial, a infecção por *Candida* spp., especialmente *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico.⁴ As espécies do gênero *Candida* vivem como comensais em diversas partes do organismo da maioria dos indivíduos saudáveis. Porém, sob certas condições ambientais, esses microrganismos podem colonizar mucosas e tecidos como patógenos oportunistas.⁵ Alguns fatores predisponentes envolvidos no desenvolvimento dessa patologia têm sido relatados: debilidade física, alergia, idade, gênero, tabaco, consumo de álcool, estatus socioeconômico, endocrinopatologias, deficiências nutricionais, antibióticos de amplo espectro, imunossupressores e alterações nos mecanismos imunológicos.^{6,7,8} Fatores locais associados à prótese também são predominantes no desenvolvimento da estomatite protética. Presença de biofilme,⁹ trauma local causado pela prótese,¹⁰ hipossalivação,¹¹ uso contínuo da prótese² e alteração do pH da saliva¹⁰ são condições locais frequentemente relacionadas a essa patologia.

Os tratamentos direcionados à estomatite protética são variados, podendo incluir terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses, substituição de próteses antigas, eliminação de irregularidades anatômicas, restabelecimento de oclusão não-traumática e restituição nutricional.^{10,12,13} Além disso, com o objetivo de proteger e preservar a integridade do epitélio da mucosa, o paciente deve dormir sem as próteses.¹⁴ A escolha de um tratamento ou a associação de mais de um deles é um aspecto a ser considerado individualmente.

Se a terapia antifúngica tópica for instituída, fármacos como nistatina e miconazol podem ser utilizados.¹⁰ Apesar de esses medicamentos serem eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da estomatite associada à *Candida* spp., muitas vezes não eliminam completamente esses microrganismos.⁴ Para pacientes

imunossuprimidos, a terapia antifúngica sistêmica pode ser recomendada.¹⁰ Entretanto, é comumente observado um quadro de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas após o tratamento com antifúngicos tópicos ou sistêmicos. Essa reincidência tem sido atribuída à sobrevivência de *Candida* spp. devido a uma concentração insuficiente do antifúngico nas superfícies das próteses.¹⁵ Assim, para o tratamento da estomatite protética, é imprescindível adotar métodos que reduzam ou, de preferência, eliminem os microrganismos dessas superfícies.¹³

O sucesso da aplicação tópica de fármacos na cavidade oral pode ser comprometido por vários fatores, dentre os quais a falta de percepção da infecção pelos pacientes, necessidade de gastos com medicação, uso contínuo das próteses, sabor desagradável do medicamento¹⁶ e posologia rigorosa.¹⁷ Além disso, é difícil manter a concentração efetiva da medicação nos tecidos infectados em decorrência do fluxo salivar, dos movimentos da língua⁴ e da deglutição, que rapidamente dissolvem e eliminam qualquer fármaco da cavidade bucal.¹⁸ A insuficiência de concentração adequada de antifúngicos convencionalmente utilizados sobre a superfície protética que mantém contato com os tecidos bucais também se deve à colonização microbiana em profundidade na resina acrílica^{19,20} e ao complexo biofilme presente nessas superfícies.²¹ Tem sido observado^{22,23,24} que após a adesão inicial dos blastóporos de *Candida* spp. a substratos como a resina acrílica, uma camada de biofilme é rapidamente formada. As células inseridas em um biofilme são embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, exibindo um fenótipo muito diferente de células planctônicas. Em particular, as células em biofilmes são menos susceptíveis a ação de fármacos antifúngicos, havendo aumento do grau de resistência com a maturação do biofilme.²⁵ Testes de susceptibilidade a fármacos antifúngicos comumente utilizados para tratamento de candidose como fluconazol, nistatina e clorexidina têm revelado resistência em isolados de *Candida* spp. inseridos em biofilmes em relação a formas planctônicas.^{22,24,26} Considerando esses aspectos, ao se reembasar uma prótese de um paciente que apresenta os tecidos paraprotéticos infectados, o contato do biofilme protético da resina acrílica da base com esses tecidos é eliminado. Assim, os tecidos recobertos pela prótese passam a manter contato com o material reembasador e os microrganismos presentes na base acrílica não continuam a infectá-los.

Materiais macios têm sido utilizados amplamente para impressão dinâmica, sendo essenciais adjuntos no tratamento da mucosa bucal traumatizada por reabsorção do rebordo residual, danos na superfície interna das próteses removíveis ou cirurgias.²⁷ Isso se deve ao fato de esses materiais auxiliarem na recuperação dos tecidos que mantêm contato com a base da prótese, assegurando conforto ao paciente.²⁸ O material macio tem como função absorver parte das forças mastigatórias incididas sobre a prótese durante a função, reduzindo, assim, a energia transmitida aos tecidos paraprotéticos associados. Tal propriedade é fundamental em rebordos altamente reabsorvidos para minimizar a possibilidade de compressão de terminações nervosas bem como nos casos de intolerância do paciente às bases acrílicas convencionais.²⁹

Estes materiais macios podem ser classificados de acordo com o tempo de permanência na cavidade bucal ou de acordo com sua composição. Assim, podem ser de longa ou de curta duração e à base de acrílicos ou de silicone.^{30,31,32} No caso dos materiais temporários à base de acrílicos, os polímeros são fornecidos na forma de pó contendo polietil metacrilato ou outros copolímeros³³, os quais são misturados ao líquido que contém 5 a 50% de álcool etílico e plastificantes como o dibutil ftalato, butil ftalil butil glicolato, butil benzil ftalato, butil benzoato ou dibutil sebacato.³⁴ Quando misturados, os solventes se difundem entre as pérolas poliméricas, as quais intumescem e então dissolvem. O material resultante é formado por um gel com cadeias poliméricas emaranhadas de característica viscoelástica apropriada para sua utilização clínica.³⁵ Uma vez que o pó não contém iniciadores e o líquido não contém monômeros, estes materiais consistem de polímeros amorfos não reticulados.³³ Devido ao pseudo entrelaçamento das cadeias poliméricas,³⁶ o material perde rapidamente suas propriedades viscoelásticas com a liberação do álcool e dos plastificantes para o meio oral.³³ Dessa forma, os materiais temporários são facilmente degradáveis e susceptíveis à colonização microbiana,³⁷ o que pode favorecer a instalação de processos patológicos como a estomatite protética bem como dificultar o tratamento de infecções presentes.^{38,39} Ainda, somado à sua porosidade, torna-se difícil sua higienização e limpeza, uma vez que são significativamente menos resistentes à escovação que as resinas acrílicas convencionais⁴⁰ e incompatíveis com certas soluções de limpeza para próteses mesmo em curtos períodos de imersão.^{41,42}

Para prolongar a longevidade clínica dos condicionadores de tecido e reembasadores resilientes e reduzir a possibilidade de acúmulo de biofilme, alguns autores propuseram métodos como a incorporação de fármacos antimicrobianos nesses materiais.^{17,27,43} Essa combinação pode ser uma terapêutica lógica no tratamento da estomatite protética por vários fatores: 1) redução do trauma causado pela superfície interna de resina acrílica termopolimerizável rígida das próteses removíveis; 2) eliminação do contato da superfície contaminada com os tecidos bucais e, conseqüentemente, do ciclo de reinfecção e 3) ação dos fármacos antimicrobianos incorporados ao material diretamente sobre os tecidos infectados.^{17,43} Neste contexto, a estomatite protética poderia ser tratada previamente à confecção de novas próteses num período relativamente curto. Isso porque, devido à sua degradação e enrijecimento gradual, a substituição dos materiais macios temporários por similares ou por reembasadores de longo prazo não deve ultrapassar duas semanas, período semelhante ao de um tratamento com antifúngico tópico convencional.^{16,17} Nos casos de perda de adaptação das bases das próteses com a área de assentamento, o reembasamento com materiais macios temporários contendo fármacos antifúngicos poderia minimizar o trauma tecidual, além de prevenir o acúmulo de biofilme até que novas próteses fossem instaladas.⁴⁴ Em feridas cirúrgicas, essa combinação poderia auxiliar na recuperação tecidual e prevenção de infecção devido à ação antifúngica dos fármacos incorporados.

As maiores vantagens da adição de antifúngicos em condicionadores de tecido ou reembasadores resilientes como método de liberação de fármacos na cavidade bucal são: 1) custo reduzido, uma vez que apenas uma fração do antifúngico é utilizada em comparação com a terapia convencional; 2) redução da necessidade de participação dos pacientes durante o tratamento;¹⁶ 3) tratamento simultâneo dos tecidos paraprotéticos injuriados e da infecção por *Candida*¹⁴ e 4) reduzida frequência de aplicação.¹⁷ Mais vantajosa será ainda esta terapêutica para pacientes idosos que apresentam capacidade visual reduzida e destreza manual limitada, o que resulta em uma higienização das próteses menos eficiente.⁴⁵ Além disso, pacientes institucionalizados podem apresentar perda de memória assim como coordenação motora e controle cognitivo reduzidos, dependendo de enfermeiros ou cuidadores para seguirem as instruções de administração dos

medicamentos e de outros cuidados para o tratamento da candidose, dificultando a instituição de terapias convencionais para esses pacientes.²⁸

A incorporação de fármacos antifúngicos em materiais macios temporários tem demonstrado ser efetiva e viável.^{14,16,17} Carter et al. (1986)¹⁴ observaram que um *soft liner* modificado pela adição de antifúngicos foi efetivo contra o crescimento de *C. albicans* durante um longo período de avaliação. Schneid (1992)¹⁷ demonstrou que um sistema de liberação de fármacos, que incorporou quatro antifúngicos (clorexidina, clotrimazol, fluconazol e nistatina) em um condicionador de tecido, inibiu significativamente o crescimento de *C. albicans* durante 14 dias de incubação. Truhlar et al. (1994)¹⁶ obtiveram adequada atividade antifúngica durante 14 dias de avaliação quando incorporaram nistatina 1.000.000 UI em dois condicionadores de tecido. Neppelenbroek et al. (2006)⁴⁶ avaliaram a efetividade durante 14 dias da incorporação de fármacos antimicrobianos (nistatina, miconazol, cetoconazol e diacetato de clorexidina) em um condicionador de tecido na inibição de colonização bacteriana (*Staphylococcus aureus*) e fúngica (*C. albicans*). Todos os grupos avaliados, exceto o controle (sem adição de fármacos), inibiram o crescimento microbiano, sendo que as inibições mais efetivas em até duas semanas foram observadas para o diacetato de clorexidina e o cetoconazol, respectivamente.

A susceptibilidade antimicrobiana de um fármaco pode ser avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) que é definida como a concentração mais baixa de um fármaco necessária para inibir um visível crescimento microbiano. Na literatura relacionada, as CMI para *Candida* não haviam sido definidas para antifúngicos adicionados a materiais macios temporários até que o estudo de Bueno et al.^{47,48} determinou espectrofotometricamente pelo ensaio de redução de sais de tetrazólio-XTT, nos períodos de 24 h, 48 h, sete e 14 dias, as porcentagens de redução de crescimento fúngico e as CMI suficientes para inibir 90% ou mais do crescimento de *C. albicans*.

Para o estudo, Bueno et al.^{47,48} selecionaram uma classe de cada fármaco antifúngico comumente utilizado para o tratamento da estomatite protética, polieno ou azóis (imidazol ou triazol), fungicida ou fungistático com ação local ou sistêmica: nistatina, miconazol, cetoconazol e itraconazol; além de um antisséptico bucal, a clorexidina. O composto poliênico nistatina foi selecionado, pois apresenta uma ação

de amplo espectro e é usado para o tratamento tópico da estomatite protética. A alta efetividade na inibição de *Candida* spp.,^{49,50} a rara detecção de cepas fúngicas resistentes e o custo acessível são vantagens deste fármaco em relação a outros antifúngicos.⁵⁰ O miconazol e o cetoconazol são classificados como imidazóis fungistáticos, usados, respectivamente, para o tratamento tópico ou sistêmico da candidose. O itraconazol é usado tanto para o tratamento como para a profilaxia de candidose em pacientes imunocomprometidos (British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party, 1992). É classificado como triazol de amplo espectro primariamente fungistático⁵¹ e tem sido utilizado como alternativa no tratamento da candidose que não responde à terapia com fluconazol.⁵² Particularmente, a clorexidina apresenta ação de amplo espectro⁵³ e significativa substantividade,⁵⁴ sendo efetivamente utilizada quando na falha de um azol, em pacientes imunocomprometidos com necessidade de uma terapia mais longa, assim como quando um biofilme misto com bactérias e fungos estiver presente.⁵⁵ A emergência de cepas resistentes à clorexidina não tem sido observada clinicamente^{8,56,57} e, por estas razões, esta bis-biguanida catiônica tem sido considerada uma alternativa apropriada em relação aos fármacos antifúngicos convencionais para o tratamento da candidose oral.⁵⁸ De acordo com os resultados obtidos, as CMI determinadas para estes fármacos incorporados aos materiais macios temporários (Softone e Trusoft) foram: 0,032, 0,256, 0,128, 0,064 e 0,256 g para nistatina, miconazol, cetoconazol, diacetato de clorexidina e itraconazol, respectivamente, para cada grama de pó dos materiais.

Apesar dessas vantagens terapêuticas, estudos prévios demonstraram que a incorporação de fármacos em materiais poliméricos, incluindo algumas marcas comerciais de condicionadores de tecido e reembasadores resilientes, pode afetar sua resistência à tração,^{18,59,60} dureza,^{61,62} rugosidade^{62,63} e resistência da união ao descolamento.^{64,65} Anteriormente à utilização desse protocolo como meio alternativo terapêutico em pacientes portadores de estomatite protética, é necessário se obter uma matriz polimérica modificada pela adição de antifúngicos que, ao mesmo tempo, não apresente propriedades físicas e mecânicas alteradas pela incorporação de fármacos e que seja eficaz na liberação e inibição do crescimento dos microrganismos relacionados ao desenvolvimento da patologia.

A concentração, o tamanho e a dispersão das partículas do fármaco na matriz polimérica são fatores importantes que influenciam sua liberação.^{28,66} Ainda não foi encontrado na literatura um estudo sobre avaliação de superfície de materiais macios temporários após a adição de fármacos em concentrações menores, definidas como efetivas para a inibição de *Candida* spp. Além de todos os fatores mencionados, também é importante determinar previamente in vitro a partir de um estudo de liberação qual seria a ingestão diária desses medicamentos adicionados aos materiais macios e se isso estaria dentro das concentrações fisiológicas recomendadas. Desse modo, foi julgado oportuno avaliar a morfologia de superfície dos materiais macios temporários Softone e Trusoft modificados pela adição de fármacos (nistatina, miconazol, cetoconazol, diacetato de clorexidina e itraconazol) em suas CMI por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal laser. Este estudo também se propôs a quantificar a liberação in vitro dos fármacos nistatina e diacetato de clorexidina a partir dos materiais macios utilizando espectrofotometria na região do Ultravioleta visível (UV-Vis).

2 REVISÃO DA LITERATURA

O levantamento bibliográfico deste estudo teve como bases de dados o *Pubmed*, *Scielo*, *Lilacs*, *Bireme*, *ProQuest* e o *ScienceDirect* e os sítios <http://www.teses.usp.br/>, <http://www.iadr.com/>, <http://www.sbpqo.org.br/> e foram selecionados trabalhos que avaliaram o comportamento de materiais para reembasamento de bases de prótese modificados pela adição de fármacos usando as seguintes palavras chaves: *tissue conditioner*, *resilient liner*, *resilient lining*, *soft liner*, *soft lining*, *antifungal*, *antimicrobial*, *nystatin*, *chlorhexidine*, *miconazole*, *ketoconazole*, *itraconazole*, *Candida growth inhibition*, *release*, *leaching*, *releasing*, empregadas isoladamente ou de forma cruzada, abrangendo o período de 1973 a 2014. A apresentação dos trabalhos foi organizada em três partes: Inibição do crescimento microbiano, Liberação in vitro e Propriedades físicas e mecânicas.

2.1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Douglas e Walker (1973)⁴³ realizaram um estudo com a finalidade de determinar uma dose efetiva de nistatina contra o crescimento de *C. albicans* para incorporar a um reembasador resiliente (Tempo) e, na sequência, utilizaram este material modificado para tratamento de pacientes com estomatite protética em um estudo clínico piloto. Uma fina camada do material macio modificado (400.000 ou 800.000 UI) ou não (controle) pela adição de nistatina foi colocada em placas de Petri estéreis. Sobre o material, foram colocados 15 mL de ágar Sabouraud e, sobre o ágar, foi inoculado 0,1 mL de um meio contendo 3×10^3 *Candida*/mL. Como controle, 0,1 mL dessa suspensão de *Candida* foi inoculado em ágar Sabouraud. Essas culturas foram incubadas por quatro dias a 37°C e as colônias, contadas. Após este período, o ágar foi substituído por um novo e, então, reinoculado e este procedimento se repetiu por 50 dias. As propriedades fungicidas do material modificado foram avaliadas em cada período e comparadas com o Tempo controle e com outro reembasador, Coe Comfort. A efetividade clínica do Tempo modificado com a concentração mais efetiva de nistatina foi avaliada em sete pacientes com diagnóstico de estomatite protética (aparência de eritema granular na área basal e eventual queilite angular). Seis pacientes com estomatite também foram tratados apenas com o reembasamento da prótese com Tempo e terapia convencional com

tabletes de nistatina de 500.000 UI quatro vezes ao dia. Todos os pacientes foram instruídos com relação à higienização de suas próteses e que deveriam removê-las durante a noite. Os tratamentos foram avaliados clinicamente e através de análises de contagens de colônias de *Candida* coletadas da mucosa palatina, superfície das próteses e da saliva dos pacientes antes e após três meses. Ambos os materiais controles exibiram alguma atividade fungicida e o Tempo foi duas vezes mais efetivo que o Coe Comfort. Em até 20 dias, o Tempo contendo 400.000 UI apresentou inibição completa do crescimento fúngico. Após 25 dias, essa inibição reduziu bruscamente. Este material com 800.000 UI de nistatina apresentou atividade fungicida por 50 dias apesar de terem sido feitas doze substituições do ágar. De acordo com os autores, a nistatina difunde-se lentamente da matriz polimérica e isto é possível devido à estrutura porosa do material, à escassa solubilidade deste fármaco em solventes hidrofílicos e ao seu relativo baixo peso molecular (948 u). O estudo piloto demonstrou que o tratamento alternativo foi tão efetivo quanto a terapia convencional. Entretanto, os autores observaram um crescimento mínimo de *Candida* em relação ao supercrescimento predominante de microrganismos filamentosos não identificados (possivelmente *Leptotrichia buccalis*), sugerindo uma estomatite protética não associada à *Candida*. Além disso, o tratamento com reembasador contendo antifúngico mostrou vantagens como: ausência de efeitos colaterais (gosto desagradável e náusea foram relatados apenas pelos pacientes que receberam tratamento convencional); não necessita da cooperação dos pacientes; pode ser executado facilmente e necessita de uma menor quantidade de fármaco (800.000 UI) em relação ao tratamento convencional (40.000.000 UI).

Em 1978, Thomas e Nutt⁶⁷ avaliaram in vitro o efeito da incorporação de nistatina ou anfotericina B no condicionador de tecido Visco-gel® sobre o crescimento de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Os fármacos foram adicionados ao pó do material nas concentrações de 500.000 ou 1.000.000 UI para a nistatina e 10 ou 20 mg para a anfotericina B. O material modificado foi espalhado uniformemente sobre placas de Petri e coberto com 15 mL de ágar Sabouraud. Um grupo controle foi obtido apenas com o meio de cultura. As placas foram semeadas com inóculos das espécies de *Candida*, em concentrações de 10^3 e 10^4 células/mL, e incubadas de três a sete dias. Nesse período, as contagens das colônias foram

realizadas, o meio, substituído e uma nova cultura, obtida para todas as placas. A anfotericina B incorporada ao Visco-gel® não apresentou qualquer efetividade antifúngica sobre os microrganismos, entretanto o material modificado pela adição de nistatina foi efetivo na inibição do crescimento das espécies de *Candida* durante o período do estudo.

Lamb e Martin (1983)⁶⁸ incorporaram acetato de clorexidina em uma resina acrílica autopolimerizável (Simplex) para avaliar sua capacidade de liberação para tratamento da candidose bucal induzida em ratos. A clorexidina foi incorporada ao material nas concentrações de 2,5, 5, 7,5 e 10%. Placas de resina acrílica com ou sem fármaco foram confeccionadas com 1 mm de espessura das quais foram retirados discos de 40 mm de diâmetro; dois para cada concentração do fármaco e dois para controle (sem clorexidina). Os discos foram imersos em 20 mL de água destilada e incubados a 37°C. Após três dias, os discos foram secos com papel e transferidos para outro recipiente com água, onde permaneceram por mais quatro dias. Posteriormente, os períodos de imersão foram aumentados para sete dias, até que um período de imersão total de 21 dias tivesse decorrido. Após cada período, a água residual foi testada para a atividade antifúngica, colocando-se uma alíquota em meio YNB inoculado com *C. albicans* a uma concentração de 10^6 células/mL. As placas com os meios de cultura foram incubadas por 72 h a 30°C e os halos de inibição foram medidos em locais aleatórios para se conseguir uma média do diâmetro inibitório. A concentração mínima que apresentou atividade antifúngica (7,5%) foi selecionada para os testes in vivo. Para tais testes, foram realizados experimentos com o fármaco para tratamento e profilaxia da candidose bucal. No experimento para testar o efeito preventivo, foram instaladas placas de acrílico no palato de dez ratos, sendo cinco modificadas com acetato de clorexidina e cinco controles. *C. albicans* foi inoculada oralmente em todos os ratos. Após quatro semanas, os animais foram sacrificados e, após a fixação e processamento, o epitélio palatino da região intermolares de cada rato foi corado e examinado quanto à infecção. No experimento para testar o efeito terapêutico, foram instaladas placas acrílicas inoculadas com *C. albicans* em dez ratos. Após quatro semanas, quando a candidose foi estabelecida no palato, cinco dos animais tiveram suas placas substituídas por outras contendo clorexidina. Após mais quatro semanas, os animais

foram sacrificados e seus epitélios palatinos da região intermolares foram examinados para a evidência histológica de candidose. Esfregaços foram inoculados em ágar Sabouraud e examinados para evidenciar o crescimento fúngico após incubação a 37°C por 48 h. Os resultados mostraram ser efetiva a incorporação de acetato de clorexidina no material acrílico como tratamento e prevenção de candidose palatal, uma vez que uma taxa desse fármaco foi encontrada fora das placas em concentrações fungicidas por até três semanas. No entanto, os autores sugeriram a necessidade de estudos que avaliassem a influência da incorporação de fármacos sobre as propriedades dos materiais.

O trabalho de Quinn (1985)⁶⁹ estudou o efeito da associação de miconazol (Daktarin) e cetoconazol (Nizoral) a três condicionadores de tecido (Ivoseal, Visco-gel e FITT) na inibição do crescimento de *C. albicans*. Como parâmetro para comparação, foram incorporados nistatina e anfotericina B aos materiais macios. Comprimidos dos agentes antifúngicos foram triturados, pesados e misturados ao pó dos materiais (n=5) nas concentrações de: nistatina (500.000 UI); anfotericina B (10 mg); anfotericina B (20 mg); miconazol (250 mg) e cetoconazol (200 mg). As misturas dos materiais após a manipulação foram vertidas e espalhadas uniformemente em placas de Petri estéreis. Como controle negativo, uma placa de cada material sem antifúngico não recebeu meio de cultura nem inoculação com *C. albicans*. Sobre as camadas dos materiais, foram vertidos 15 mL de ágar Sabouraud, o qual foi inoculado com suspensões de 10^3 e 10^4 células/mL de *C. albicans* e a placa foi incubada a 37°C por 14 dias. Neste período, as colônias viáveis foram contadas três vezes por semana e o ágar, substituído e reinoculado no sétimo dia. Ao término dos 14 dias de incubação, uma contagem final das colônias foi realizada. Os autores selecionaram duas semanas como período máximo de avaliação por ser equivalente ao tempo médio de duração de um condicionador de tecido aplicado a uma prótese removível. As placas do controle positivo de todos os materiais apresentaram o mesmo padrão de crescimento de *C. albicans* observado com as suspensões utilizadas na inoculação. Não houve crescimento fúngico visível nas placas do controle negativo dos três condicionadores de tecido. No terceiro dia, uma discreta inibição de *C. albicans* foi observada nas placas de Visco-gel® e FITT com anfotericina B, ao passo que nas de Ivoseal essa inibição foi maior. O

crescimento fúngico nas placas de Visco-gel® e FITT com anfotericina B se igualou ao observado naquelas referentes ao controle positivo no sexto dia. Neste mesmo período, uma sutil inibição de *C. albicans* ainda era presente nas placas de Ivoseal, mas após nove dias a anfotericina B perdeu seu efeito antifúngico. Todas as combinações dos materiais com nistatina, miconazol e cetoconazol foram inibitórias do crescimento fúngico ao longo dos 14 dias de avaliação. Segundo os autores, os resultados obtidos comprovaram a ineficácia da anfotericina B como agente antifúngico quando incorporada a materiais macios. Foi concluído que, quando adicionados aos condicionadores de tecido avaliados, o miconazol e o cetoconazol foram tão efetivos quanto a nistatina na inibição completa do crescimento fúngico visível.

O objetivo do estudo de Truhlar et al. (1994)¹⁶ foi avaliar a atividade antifúngica de reembasadores resilientes temporários modificados pela adição de nistatina, bem como o comportamento a longo prazo desse sistema em um ambiente aquoso. O pó da nistatina foi incorporado às proporções de pó dos materiais Lynal e Visco-gel®, nas seguintes dosagens: 0 (controle), 100.000, 300.000, 500.000 e 1.000.000 UI. O líquido dosado de cada material foi adicionado à mistura de pós em uma placa de Petri. Após a plastificação dos materiais, o meio de cultura ágar Sabouraud dextrose contendo cloranfericol e ciclohexamina foi dispensado sobre os mesmos em uma inclinação que permitiu espessuras de ágar variáveis entre 1 e 9 mm. A superfície do ágar foi inoculada com swab estéril contendo *C. albicans* (10^4 células/mL) e todas as placas foram incubadas por 48 h a 37°C. Então, a profundidade máxima na qual se observou inibição de *C. albicans* foi mensurada com sonda periodontal. Após esse procedimento, o ágar de cada placa foi removido da superfície do material, sendo repostado, reinoculado e novamente mensurado. Esse processo foi repetido aos sete, dez e 14 dias. Para cada concentração de nistatina de ambos os materiais, três placas foram confeccionadas, sendo obtidas seis mensurações por placa. Para avaliar o efeito da exposição em condições aquosas, amostras dos materiais modificados com as mesmas concentrações de nistatina foram preparadas da forma como descrito previamente, cobertas com 40 mL de água destilada e incubadas a 37°C. Decorridos quatro dias, a água foi removida e sobre os materiais secos, o ágar inclinado foi aplicado, inoculado e as mensurações,

obtidas. Água destilada foi novamente dispensada sobre as mesmas placas e, após 14 dias a 37°C, o ágar foi substituído e inoculado para que novas mensurações fossem efetuadas ao final de um novo período de incubação de 48 h. Com o intuito de simular a constante alteração do ambiente bucal, foi realizado outro experimento com substituição da água das placas em dois, quatro, sete, dez e 14 dias. Ao final do tempo de exposição ao ambiente aquoso, a água foi removida das placas e o material resiliente presente no fundo das mesmas foi seco ao ar. Uma alíquota de ágar inclinado foi dispensada sobre o material de cada placa e, então, inoculada com *C. albicans*. Após 48 h a 37°C, o crescimento fúngico presente nas placas foi mensurado. A média das mensurações de todos os experimentos foi expressa em valores máximos de profundidade de inibição em ágar (mm). Em cada condição, uma placa controle sem adição de nistatina foi confeccionada. A atividade antifúngica da água removida das placas também foi avaliada. Para isso, 1 mL da água de cada amostra foi colocado em tubos de ensaio contendo 1 mL de caldo Sabouraud inoculado com 0,1 mL de *C. albicans* (10^3 células/mL). Posteriormente à incubação por 24 h, os tubos foram centrifugados e visualmente avaliados quanto à turvação, indicativa de crescimento fúngico. Para expressar as profundidades de ágar mensuradas em unidades disponíveis de nistatina, utilizou-se o método de calibração do dimetilsulfóxido. Para ambos os materiais, os resultados revelaram perda inicial significativa da atividade antifúngica, com a maior redução observada entre os dias zero e dois. Entretanto, comparado ao Lynal, o material Visco-gel demonstrou menor perda inicial da atividade antifúngica até o dia quatro. Entre os dias sete e 14, ambos os reembasadores demonstraram efeitos inibitórios constantes. Maiores concentrações de nistatina evidenciaram maior inibição do crescimento de *C. albicans*. Os controles de ambos os materiais apresentaram atividade antifúngica insignificante ao longo da avaliação. Quando expostos ao meio aquoso por 14 dias, os materiais demonstraram perda ainda maior das propriedades antifúngicas em relação às condições a seco, sobretudo para as concentrações de nistatina de 300.000 e 500.000 UI. No entanto, amostras de Lynal e Visco-gel contendo 1.000.000 UI de nistatina não foram acentuadamente afetadas pelo ambiente aquoso. A análise visual da água removida das amostras de ambos os materiais com 1.000.000 UI de nistatina revelou inibição de *C. albicans* até o dia dois, com perda de efetividade antifúngica após o dia quatro. Foi concluído que a incorporação de nistatina nos reembasadores resilientes testados permitiu a

liberação de fármaco em até 14 dias. Com base nos resultados, os autores sugeriram que os materiais modificados poderiam ser considerados como modalidade terapêutica promissora para a estomatite protética, com a vantagem da menor necessidade de participação ativa dos pacientes, sobretudo os idosos e institucionalizados.

Chow et al. (1999)⁷⁰ avaliaram a efetividade da incorporação de antifúngicos em condicionadores de tecido e seu uso para liberação de fármacos e tratamento da estomatite protética. Os antifúngicos nistatina, fluconazol e itraconazol nas concentrações de 1, 3, 5, 7, 9 e 11%, com e sem saliva, foram incorporados aos materiais Coe Soft, Visco-gel® e FITT. Isolados clínicos de *C. albicans* deram origem a um inóculo com 10^3 células/mL. Uma alíquota de 0,1 mL do inóculo foi colocada em cada placa de cultura contendo Sabouraud para incubação a 37°C por 72 h. Foram obtidas cavidades nas placas inoculadas por meio de perfurações no ágar de 6 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade. Os materiais, modificados ou não pelos fármacos, foram injetados após a manipulação nas cavidades das placas de cultura e incubados por 14 dias para a mensuração diária dos halos de inibição. As placas contendo apenas os condicionadores de tecido não apresentaram inibição do crescimento fúngico. O pico de atividade dos materiais modificados foi entre dois e quatro dias, período após o qual se observou um platô. O itraconazol apresentou maior atividade fungicida do que o fluconazol ao passo que os menores diâmetros de halos de inibição foram observados com a nistatina. Para todos os fármacos, a concentração de 5% demonstrou maior efeito antifúngico que as misturas com 7, 9 e 11%. Os corpos de prova com saliva apresentaram maior inibição de *C. albicans* quando comparados àqueles sem esse meio, sendo as combinações mais efetivas as de itraconazol a 5% com Coe-soft e FITT. Os autores concluíram que a incorporação de antifúngicos em condicionadores de tecido poderia ser utilizada para o tratamento da estomatite protética e recomendaram a utilização de itraconazol a 5% incorporado aos materiais Coe Soft ou FITT para avaliações clínicas. O pico de atividade antifúngica ao terceiro dia sugeriu que os materiais modificados com fármacos poderiam ser substituídos neste período para se obter máxima eficácia do método.

O estudo piloto de Geerts et al. (2008)⁵⁰ determinou in vivo o efeito da nistatina (500.000 UI) liberada a partir do condicionador de tecido Visco-gel®, na contagem de leveduras de *C. albicans* em pacientes com estomatite protética. Trinta pacientes portadores de próteses, com diagnóstico de estomatite protética e presença de *C. albicans*, foram divididos em dois grupos: 1- controle, tratamento com condicionamento tecidual e confecção de novas próteses e 2-tratamento com o condicionador de tecido modificado pela adição de nistatina e confecção de novas próteses. No início do estudo, os pacientes removiam suas próteses e faziam bochecho durante 1 min com tampão fosfato salino estéril para confirmar a presença e fornecer a contagem inicial de *C. albicans*. Isto foi repetido para ambos os grupos a cada dois dias durante os 14 dias. As suspensões obtidas foram incubadas aerobicamente a 37°C em placas de ágar dextrose Sabouraud por 24-48 horas. No grupo teste, um tablete de Mycostatin® era pulverizado e incorporado homogeneamente ao pó do Visco-gel® e, em seguida, o líquido era adicionado à mistura. Todos os pacientes foram instruídos quanto ao cuidado e à higiene das próteses e do material macio e foram orientados a não remover as próteses à noite. A atividade antifúngica da nistatina também foi determinada a cada visita pela remoção e colocação de amostras de 4 mm de diâmetro do condicionador de tecido em placas de ágar Sabouraud, inoculadas com uma suspensão de 0,1 mL contendo 10^8 células de *C. albicans* por mL e incubadas a 37°C por 48 h. A contagem média de leveduras do grupo controle diminuiu até o quarto dia e, segundo os autores, pode ser explicada pela conscientização dos pacientes com o cuidado das próteses e da higiene das mesmas, pela sua limpeza antes da aplicação do material e pela eliminação do contato das bases das próteses com a mucosa do palato. Após o quarto dia, a contagem de leveduras aumentou até o final do experimento e, no dia 14, a contagem de unidades formadoras de colônias foi maior do que a contagem inicial. Isto porque, devido às suas características, o material por si só promove um crescimento fúngico. A contagem média de leveduras do grupo teste reduziu até o sétimo dia e, na sequência aumentou, porém ao final dos 14 dias, os resultados foram significativamente inferiores à contagem inicial. Este fato sugeriu o efeito combinado da limpeza mecânica da prótese associada à liberação de nistatina e o aumento após uma semana pode ter sido devido à redução da concentração de

nistatina. As amostras do condicionador de tecido modificado demonstraram atividade antifúngica in vitro durante todo o período do experimento e as amostras controles não apresentaram inibição fúngica pelo teste de difusão em ágar. Devido ao aumento da contagem de leveduras de *Candida* após quatro dias do condicionamento tecidual e após sete dias do tratamento experimental, os autores recomendaram que os materiais fossem substituídos nestes períodos. Os autores concluíram que a nistatina 500.000 UI incorporada ao condicionador de tecido reduziu significativamente o número de células viáveis de *C. albicans* em amostras de saliva de pacientes com estomatite protética. Relataram, ainda, que um estudo clínico com poder amostral maior é recomendado para que seja determinada a significância clínica dos achados deste estudo piloto.

A efetividade da incorporação de antifúngicos em gel a um condicionador de tecido na inibição in vitro do crescimento de *C. albicans* foi avaliada por Radnai et al.⁷¹ em 2010. O experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi avaliado e comparado o efeito antifúngico de dois fármacos (digluconato de clorexidina a 1% e miconazol 24 mg/mL) adicionados a um condicionador de tecido (Visco-gel®). Para permitir a incorporação dos géis antifúngicos, o material foi manipulado em uma proporção mais viscosa (3 g de pó para 1,8 mL de líquido) que a recomendada pelo fabricante. Ao material manipulado foi adicionado um dos géis antifúngicos testados nas proporções volumétricas de 5, 10, 15, 20 e 25%. A mistura resultante de cada condição experimental foi geleificada por 30 min entre duas placas de vidro com o objetivo de formar uma camada de 2 mm de espessura, da qual foram cortados discos de 9 mm de diâmetro. Foram obtidos seis discos de cada uma das concentrações dos antifúngicos utilizados. Como controle geral, o Visco-gel® foi manipulado de acordo com as condições do fabricante (3 g/2,2 mL) e não recebeu a incorporação dos fármacos. Para a avaliação do efeito antifúngico, uma alíquota de 0,5 mL de *C. albicans* (NCYC 1467) na concentração de 10^7 células/mL foi semeada em placas de Petri contendo Sabouraud. Em cada placa inoculada, foram colocados quatro discos, sendo dois experimentais (um por fármaco em cada concentração), um controle geral e um controle positivo representado por um disco de papel de 5 mm de diâmetro impregnado com 10 µL de clorexidina a 0,2% (Corsodyl). Esses procedimentos foram realizados em duplicata e todas as placas foram incubadas a

37°C por 24 h. Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição do crescimento de *C. albicans* foram mensurados. Os diâmetros médios (mm) foram calculados a partir de três mensurações realizadas em cada disco. Na segunda etapa, a inibição de *C. albicans* pelo condicionador de tecido modificado pela adição do gel de miconazol a 20% foi avaliada após longos períodos de imersão em água. Discos (n=3) foram imersos individualmente em 10 mL de água destilada estéril a 37°C em cada um dos seguintes períodos: 1, 2, 4, 6 e 8 h; 1, 3, 6, 7, 14, 21 e 28 dias. Depois de removidos, os discos foram enxaguados para remoção de resíduos do antifúngico, suavemente secos em papéis absorventes e colocados nas placas de Sabouraud semeadas com *C. albicans*. Em cada placa, foram colocados três discos experimentais e o controle positivo. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e os halos de inibição, mensurados. Na primeira etapa, a inibição do crescimento de *C. albicans* não foi observada nos discos do controle geral e naqueles contendo clorexidina nas diversas concentrações utilizadas. Por isso, este antifúngico não foi avaliado na segunda etapa. Os diâmetros dos halos de inibição do Visco-gel contendo miconazol foram proporcionalmente maiores com o aumento da concentração. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre os halos médios das várias concentrações do antifúngico, exceto entre as de 15 e 20% (21,16 e 21,49 mm, respectivamente). Os discos de papel do controle positivo apresentaram halos de inibição com média de 8,06 mm. Na segunda fase, foi observada uma diminuição gradativa do efeito inibitório do miconazol ao longo do tempo de imersão em água. Ao final de 28 dias, a porcentagem de redução média de inibição atingiu 34%. O estudo mostrou que o gel de miconazol incorporado a um condicionador de tecido foi efetivo em inibir o crescimento de *C. albicans* in vitro, sendo o grau de inibição diretamente proporcional à concentração de fármaco. A ação antifúngica do miconazol foi diminuída ao longo do tempo de imersão em água. Os autores sugeriram que o método de inibição de *C. albicans* avaliado no estudo tem a vantagem de não requerer a colaboração do paciente.

A investigação de Falah-Tafit et al. (2010)⁷² teve por objetivo avaliar a eficácia in vitro da combinação de dois antifúngicos (nistatina e fluconazol) com um condicionador de tecido (Acrosoft) na adesão e colonização de *C. albicans*. Foram confeccionados corpos de prova (n=8; 5 x 1 mm) do material para a adição dos

agentes antifúngicos em uma das concentrações testadas (1, 3, 5 e 10%). Um grupo controle negativo, composto apenas pelo condicionador de tecido, também foi obtido. O inóculo de *C. albicans* foi produzido a uma concentração de 10^6 células/mL e colocado em poços de placas de cultura, nos quais foram imersos os corpos de prova para a incubação a 35°C por 48 h sob agitação de 150 rpm. Após esse período, os corpos de prova foram lavados com água estéril para remoção das células não aderidas e, então, imersos individualmente em tubos contendo solução salina. Os tubos foram deixados em ultrassom por 5 min para remover os microrganismos aderidos à superfície do material. Do líquido de cada tubo, foram realizadas dez diluições seriadas e 100 µL de cada suspensão foram semeados em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas por 48 h previamente à contagem de colônias de *C. albicans*. Todas as concentrações de nistatina foram eficazes na inibição da adesão celular e do crescimento de *C. albicans* na superfície do condicionador de tecido. Para o fluconazol, apenas a concentração de 10% promoveu completa inibição. Os autores concluíram que, quando incorporadas ao condicionador de tecido, as concentrações 1 a 10% de nistatina e de 10% do fluconazol foram capazes de inibir a adesão e o crescimento fúngico.

A efetividade dos fármacos itraconazol e cetoconazol incorporados a dois condicionadores de tecido (Viscogel e GC Soft) na inibição do crescimento de *C. albicans* foi avaliada no estudo in vitro de Gupta et al. (2011)⁷³ por meio da técnica de difusão em ágar. Oito grupos foram avaliados: Viscogel; GC Soft; cetoconazol; itraconazol; cetoconazol + Viscogel; cetoconazol + GC Soft; itraconazol + Viscogel e itraconazol + GC Soft. O inóculo para o teste de susceptibilidade foi preparado com *C. albicans* (ATCC 10231) em meio de ágar Sabouraud dextrose, incubado por 24 h a 35°C. Cinco diferentes colônias foram retiradas e suspensas em 5 mL de solução salina estéril. A suspensão resultante foi centrifugada e ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Cem placas foram preparadas com ágar Mueller-Hiton, 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno. Em quatro placas, nenhuma alteração foi feita e elas serviram como indicador de crescimento de *C. albicans*. Em outras oito placas, foram colocados apenas 10 µg de itraconazol ou cetoconazol (quatro cada). Os condicionadores de tecido foram manipulados em condições assépticas de

acordo com as instruções do fabricante e inseridos em quatro placas cada. As 80 placas restantes foram divididas em quatro grupos para cada combinação dos condicionadores de tecido com os dois fármacos antifúngicos. Para estes últimos quatro grupos, primeiramente foi feita a mistura do pó ao líquido do material e, em seguida, um disco do fármaco foi embebido na mistura tendo certeza de que todas as áreas tinham sido cobertas pelo condicionador e, então, colocado na placa. Todas as placas foram incubadas a 35°C por 24 h. Os resultados mostraram que não houve inibição do crescimento fúngico para os grupos dos condicionadores de tecido. Os discos contendo apenas os fármacos demonstraram halos de inibição de acordo com os limites padrão estabelecidos. Para as combinações contendo cetoconazol, o condicionador GC Soft modificado inibiu significativamente mais o crescimento de *C. albicans* que o material Viscogel, provavelmente pela diferença de composição química entre os materiais. Não houve inibição de crescimento fúngico para ambos os materiais com adição de itraconazol que, de acordo com os autores, possivelmente poderia ser explicada por uma interação deste fármaco com as matrizes poliméricas, impedindo sua ação.

Em 2012, Chopde et al.⁷⁴ compararam a atividade antifúngica para *C. albicans* de dois condicionadores de tecido modificados com miconazol, nistatina e fluconazol. Placas de ágar Mueller-Hitton foram inoculadas com uma suspensão de *C. albicans* ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Quatro placas serviram como indicador do crescimento de *C. albicans* pura. Discos dos antifúngicos foram colocados sobre outras doze placas. Os condicionadores de tecido (GC Soft e Viscogel) foram misturados e os discos foram completamente incorporados à mistura para serem então levados às placas inoculadas. Essas placas foram incubadas a 37°C por 24 h para mensuração dos halos de inibição. A inibição fúngica máxima foi observada com o fluconazol seguido, respectivamente, pelo miconazol e nistatina. Quando testados isoladamente, os condicionadores de tecido não demonstraram atividade antifúngica. Os grupos de GC Soft mostraram atividade antifúngica levemente superior aos grupos de Viscogel. Os autores concluíram que a incorporação dos fármacos testados nos condicionadores de tecido apresentou uma adequada atividade antifúngica para *C. albicans*.

Salim et al. (2013)⁷⁵ estudaram a eficácia de um material polimérico com impregnação de fluconazol ou diacetato de clorexidina contra cepas de *C. albicans* suscetível e resistente ao fluconazol e de *C. glabrata* resistente ao fluconazol. O polímero foi preparado com a mistura de 1 g de polietil metacrilato e 0,6 mL de tetrahidrofurfuril metacrilato e polimerização química durante 15 min. O material modificado foi preparado substituindo-se 10% em peso de polietil metacrilato por 10% de diacetato de clorexidina, 10% de fluconazol puro ou 25% de fluconazol em pó de cápsulas (equivalentes a 10% de fluconazol puro). Discos controles e modificados (n=5; 40 x 0,5 mm) foram confeccionados e armazenados, individualmente, em 20 mL de água destilada estéril a 37°C durante 28 dias, tendo sido agitados três vezes ao dia. A quantidade de fármaco liberada foi mensurada por espectrofotometria UV a 220 nm. Triplicatas de dez diluições seriadas dos eluatos foram analisadas nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. As absorvâncias dos eluatos controles foram usadas como referência. As concentrações dos fármacos em cada eluato foram calculadas usando curvas de calibração com concentrações conhecidas. Para os ensaios microbiológicos, foram usadas as seguintes cepas de *Candida*: *C. albicans* ATCC 90028 (CMI 0,25-1 mg/L) e *C. albicans* F/2511 e *C. glabrata* F/4023 resistentes ao fluconazol, ambas com CMI > 64 mg/L. As cepas foram cultivadas em ágar Sabouraud por 48 h e, após este período, duas colônias foram inoculadas em 10 mL de água destilada e a densidade celular, ajustada a 1×10^5 células/mL. As CMI foram determinadas usando o método da microdiluição M27-A3. Duas diluições seriadas de fluconazol puro e fluconazol de cápsulas (0,125 – 2048 mg/L) e de clorexidina (0,1 – 50 mg/L) foram preparadas em água destilada estéril e um inóculo de 1×10^3 microrganismos/mL foi usado. Após 48 h de incubação a 37°C, o crescimento celular foi medido em espectrofotometria a 490 nm. Para o fluconazol, a CMI foi a concentração que reduziu a densidade ótica em 50% em relação ao controle sem fármaco e, para a clorexidina, foi aquela que reduziu o crescimento em 80%. Outro ensaio microbiológico, o método *Time-kill*, também foi feito para determinar a atividade fungicida dos eluatos dos espécimes. Cem µL da diluição celular de 1×10^5 /mL foram transferidos para tubos estéreis contendo 900 µL dos eluatos de cada grupo em cada período de análise. Os tubos foram incubados a 37°C e alíquotas foram removidas após 1, 2, 4, 6 e 24 h pós-inoculação.

Dez µL das amostras e duas das dez diluições seriadas foram plaqueadas em ágar Sabouraud e incubadas a 37°C por 48 h. A viabilidade da diluição celular foi usada como controle e o efeito fungicida foi definido como 100% de inibição celular. Ambos os fármacos foram liberados do sistema polimérico durante 28 dias e as concentrações liberadas foram fungicidas contra os três isolados de *Candida*, incluindo os resistentes ao fluconazol, por pelo menos sete dias. Os eluatos de clorexidina eliminaram todos os isolados de *Candida* mais rapidamente que as duas formulações de fluconazol. Isto foi explicado pelas altas concentrações de clorexidina liberadas que excediam a CMI de 6,25 mg/L e pela rápida absorção da clorexidina por estas espécies de *Candida*. Os eluatos de clorexidina eliminaram todos os isolados de *Candida* em apenas 1 h em relação aos de fluconazol que requereram 24 h. A proporção de células viáveis da cepa de *C. glabrata* resistente reduziu mais lentamente que a cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol à mesma CMI para ambas as formulações deste fármaco. Uma velocidade de inibição celular mais lenta tem consequências significantes, uma vez que pode acarretar seleção e emergência de resistência. A maior liberação dos fármacos ocorreu no primeiro dia e equivaleria a uma quantidade de 37 mg de clorexidina e de 30 mg de fluconazol no caso de um reembasamento de uma prótese total. De acordo com os autores, essas quantidades liberadas são seguras e dentro das doses recomendadas.

A eficácia do fluconazol e da clorexidina incorporados em um polímero a base de polietil metacrilato e tetrahidrofurfuril metacrilato na prevenção da formação in vitro de biofilme de *C. albicans* foi estudada por Salim et al.⁷⁶ em 2013. Para preparar os discos (n=10; 10 x 1 mm) controles, cinco g de polietil metacrilato e 3 mL de tetrahidrofurfuril metacrilato foram misturados e deixados polimerizar a 37°C sob pressão de 2 bar. Para os discos impregnados, foram substituídos 10% em peso de polietil metacrilato por 10% de fluconazol ou de clorexidina. Para preparar o inóculo, *C. albicans* (ATCC 90028) foi semeada em ágar Sabouraud durante o período noturno e, então, inoculada em 20 mL de meio YPD. O inóculo foi incubado em agitador orbital (100 rpm) durante a noite a 37°C. As células foram lavadas em solução de tampão fosfato salino e ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina e tampão ácido propanosulfônico morfolino. A

densidade celular foi ajustada para 1×10^6 células/mL para o inóculo. A CMI (0,25 mg/L) para o fluconazol foi confirmada seguindo o método CLSI. Todos os discos foram lavados três vezes em água estéril e imersos em tampão fosfato salino por 5 min. Lavados mais três vezes em água estéril e colocados em uma placa de 24 poços. Em seguida, 2 mL do inóculo de *C. albicans* em meio RPMI-1640 foram adicionados a cada poço (2×10^6 células/disco) e as placas foram incubadas a 37°C. O meio foi removido e substituído nos intervalos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias. Em cada um destes períodos, foram quantificados a biomassa de biofilme pela coloração cristal de violeta (a 584 nm) e o metabolismo celular pelo ensaio de XTT (a 490 nm). A atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* aumentou continuamente durante o período de 28 dias, tendo sido observado um rápido aumento entre os dias dois e sete. Também houve um aumento crescente da biomassa de biofilme durante 28 dias e o maior aumento foi entre sete e 14 dias. Houve uma correlação positiva entre a biomassa do biofilme de *C. albicans* e o metabolismo celular em todos os grupos. Discos contendo fluconazol exibiram inibição deficiente da biomassa de biofilme em 8,8% e da atividade metabólica em 12,6%. Após dois dias, sua redução de atividade metabólica foi um pouco melhor que os controles sem fármacos. Essa resistência pode ser explicada por diferentes mecanismos, como regulação positiva das bombas de efluxo e densidade celular aumentada. Também é possível que tenha havido uma demora na obtenção de eluatos com concentrações fungicidas. Em contrapartida, os espécimes modificados por clorexidina foram altamente efetivos, inibindo significativamente o biofilme em 75% e o metabolismo celular em 84% em todos os períodos em avaliação. Adesão e alguma divisão celular ocorreram e refletiram o lento, porém crescente, aumento da biomassa com o tempo. Segundo os autores, foi previamente relatado que uma concentração oito vezes maior que a CMI da clorexidina é requerida para inibir biofilme pré-formado de *C. albicans*. As altas concentrações de clorexidina liberadas neste estudo poderiam romper a formação de biofilme em todos os estágios, desde a aderência até a maturação. Tem sido demonstrado que a clorexidina reduz a aderência de *C. albicans* a superfícies e suprime a formação de hifas. Este sistema polimérico de liberação contendo clorexidina pode apresentar potencial como reembasador para o tratamento da estomatite protética, uma infecção com biofilme fúngico e bacteriano de difícil tratamento e alta recorrência. Ainda, exposições subterapêuticas dos azoles aos biofilmes de *Candida*, que estão totalmente associadas à emergência de resistência

fúngica, poderiam ser evitadas. Os resultados também evidenciaram a atividade deficiente do fluconazol contra biofilmes, questionando sua eficácia profilática em pacientes com risco de fungemia.

No mesmo ano, Bueno et al.⁴⁸ avaliaram a ação antifúngica e determinaram as CMI's de cinco fármacos utilizados no tratamento de estomatite protética, incorporados a materiais macios temporários. Um biofilme de *C. albicans* (SC 5314) foi formado sobre corpos de prova (10 x 1 mm) dos materiais (Trusoft e Softone) modificados ou não (controle) pelos fármacos (nistatina, miconazol, cetoconazol, itraconazol e diacetato de clorexidina). Diferentes concentrações foram testadas para cada condição (n=6) e a viabilidade celular foi determinada espectrofotometricamente pelo ensaio de redução de sais de tetrazólio-XTT, nos períodos de 24 h, 48 h, 7 e 14 dias. Cada corpo de prova foi colocado individualmente em um poço de uma placa de cultura, sendo imerso em 2 mL de inóculo (1×10^7 células/mL). As placas de cultura foram colocadas em incubadora com agitação sob velocidade de 75 rpm por 90 min a 37°C. Em seguida, os corpos de prova foram transferidos para outros poços contendo 2 mL de tampão fosfato salino para remoção das células não aderidas. Finalmente, foram imersos em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640, onde permaneceram para formação do biofilme até um dos períodos da avaliação. Na sequência, foram submetidos à análise colorimétrica XTT a 550 nm. Foram definidas como CMI's, as concentrações que inibiram 90% ou mais do crescimento fúngico. A confirmação da susceptibilidade fúngica às CMI's foi realizada pela análise em microscópio confocal de varredura a laser. As CMI's dos fármacos incorporados aos materiais macios (por grama) foram: 0,032; 0,256; 0,128; 0,256 e 0,064 g para nistatina, miconazol, cetoconazol, itraconazol e diacetato de clorexidina, respectivamente. As imagens microscópicas dos materiais modificados por nistatina, diacetato de clorexidina e cetoconazol não evidenciaram células fúngicas viáveis. Os antifúngicos incorporados aos materiais macios inibiram o crescimento fúngico em até 14 dias e as menores CMI's foram obtidas com nistatina e diacetato de clorexidina.

2.2 LIBERAÇÃO IN VITRO

Addy (1981)⁷⁷ realizou um estudo in vitro sobre o potencial de liberação de clorexidina a partir de resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de próteses (Trevalon e Croform) e de um condicionador de tecido (Visco-gel®). Foram confeccionados corpos de prova circulares (25 x 3 mm), com ou sem acetato de clorexidina nas concentrações de 2, 5 e 10%. Os corpos de prova foram reinoculados diariamente nas placas de Petri até que não houvesse mais inibição do crescimento bacteriano (*S. mutans*). A liberação do fármaco também foi observada em água, simulando sua liberação na saliva na cavidade bucal. Corpos de prova adicionais (n=3) com ou sem adição de fármaco foram imersos separadamente em frascos contendo 10 mL de água destilada a 37°C. Diariamente, a água da liberação era analisada espectrofotometricamente a 251 nm. Semanalmente, uma alíquota de 150 µL da água que continha os corpos de prova era inoculada em placas contendo *S. mutans* para incubação por 24 h a 37°C e os diâmetros dos halos de inibição eram, então, mensurados. Foram feitas análises das superfícies dos corpos de prova em MEV após polimento (#1200) e irrigação com água destilada. Os resultados dos testes de halos de inibição mostraram que a liberação de clorexidina se manteve por até 32 dias nas resinas acrílicas e por 39 dias no condicionador de tecido. Nenhuma inibição bacteriana foi observada nos grupos sem adição do fármaco. Nas leituras espectrofotométricas, observou-se que o nível de clorexidina liberada sofreu uma queda progressiva para todos os materiais avaliados. No entanto, os períodos de liberação foram maiores nas concentrações superiores de acetato de clorexidina, de modo que a adição a 10% apresentou ação antibacteriana por um período superior a 100 dias. As análises em MEV demonstraram a presença do fármaco em toda a matriz polimérica para os corpos de prova não imersos em água e apenas em suas superfícies para aqueles que foram imersos.

O objetivo do estudo de Patel et al. (2001)⁷⁸ foi determinar se um sistema polimérico composto por polietil metacrilato/tetrahidrofurfuril metacrilato para liberação de clorexidina que tivesse significativa eficácia contra o crescimento de *C. albicans* poderia ser desenvolvido. Diacetato de clorexidina foi misturado ao pó do pré-polímero nas concentrações 0 (controle), 4,5, 6, 9 e 12% em peso. O líquido

contendo 2,5% em volume de *N-N*-dimetil-*p*-toluidina, na proporção de 1 g de pó para 0,6 mL de líquido, foi então adicionado. Corpos de prova ($n=2$; 42 x 10 x 1 mm) foram polimerizados à temperatura ambiente sob pressão de 2 atm. A absorção de água foi mensurada gravimetricamente. A liberação de clorexidina foi medida usando espectrofotometria UV. Os espécimes foram imersos em 100 mL de água destilada e alíquotas de 3 mL foram removidas em intervalos durante 14 dias. A quantificação da clorexidina liberada foi possível com a utilização de uma curva de calibração. Duas cepas de *C. albicans* foram utilizadas (132A e 132ACR) no estudo. 132ACR é uma mutante espontânea da 132A e é resistente ao cetoconazol, miconazol e fluconazol e a 132A é suscetível aos três azóis. As cepas foram semeadas e mantidas aerobicamente a 37°C em ágar Columbia com 5% de sangue desfibrinado de cavalo. O inóculo foi preparado a partir da transferência de uma colônia para o meio YPD e incubação aeróbica durante a noite a 37°C. As culturas foram centrifugadas a 6000 rpm por 6 min e então ressuspensas em meio de cultura. Os sistemas de liberação contendo 9 ou 12% de clorexidina foram testados em duplicata, após exposição durante 60 s à luz UV, para avaliar a inibição do crescimento da *C. albicans*. Essa avaliação foi feita de duas formas: 1. a partir de medidas turbidimétricas a 600 nm do crescimento de microrganismo após 24 h de exposição aos corpos de prova e 2. a partir de contagem de formação de colônias após exposição aos corpos de prova por 5 h e incubação aeróbica em ágar sangue a 37°C durante a noite. Os resultados mostraram que a absorção de água do sistema polimérico aumentou com o aumento da concentração de clorexidina adicionada: o polímero controle absorveu 12% de água e o sistema contendo 12% de clorexidina absorveu 22% de água durante seis meses. A liberação de clorexidina foi caracterizada por uma alta liberação inicial seguida por uma liberação mais lenta e difusão-controlada por 14 dias. Apesar de 6 a 12% da clorexidina ter sido liberada neste período, entre 50 a 80% da quantidade total liberada ocorreu nas primeiras 24 h. A liberação que consistiu de dois estágios apresentou um rápido processo inicial de acordo com a lei de Fick seguido pelo desenvolvimento de gotículas de água em sítios osmoticamente ativos. Na presença da clorexidina, o *burst* inicial provavelmente reflete a liberação superficial. E a liberação subsequente difusão-controlada pode ser o resultado de um processo complexo envolvendo a formação das gotas de água ao redor das partículas de diacetato de clorexidina e a interação dessas gotas com o processo de absorção de água do polímero. Houve uma relação

dose-dependente, sendo que mais clorexidina foi liberada pelos espécimes com maior quantidade de clorexidina incorporada. Foi observado que a quantidade de clorexidina adicionada ao sistema polimérico foi suficiente para inibir ambas as cepas sensível e resistente aos azóis e, como conclusão, os autores relataram que a absorção de água anômala deste sistema permite uma liberação controlada do fármaco que poderia auxiliar no tratamento de infecções por *Candida* intratáveis ou persistentes.

Lin et al.,⁷⁹ no ano de 2003, avaliaram in vitro a liberação dos fármacos hidrocloridrato de tetraciclina, hidrocloridrato de doxiciclina, diacetato de clorexidina e nistatina e das associações de nistatina com os outros três fármacos, em concentrações efetivas, a partir de um copolímero biocompatível (etileno acetato de vinila) para liberação controlada por períodos prolongados. Além disso, avaliaram o efeito da temperatura (24°C e 37°C) e do meio (água e água/etanol 4:1) na liberação desses fármacos a partir do copolímero. O copolímero e os fármacos foram dissolvidos, na proporção de 40:1, em 70 mL de diclorometano a 38°C por 6 h. Amostras (n=3; 30 x 30 x 1 mm) foram coletadas dos polímeros modificados e imersas em 10 mL em uma das soluções de armazenamento (pH 5,4), dependendo da solubilidade dos fármacos. Os copolímeros modificados pela incorporação de nistatina e combinações com este fármaco foram armazenados apenas em água/etanol (24°C) devido à insolubilidade da nistatina em água. As análises em espectrofotometria foram feitas diariamente durante 14 dias e, após cada análise, o meio era substituído totalmente. Os valores de comprimento de onda utilizados para o diacetato de clorexidina e para a nistatina foram de 257,5 e 306 nm, respectivamente. Foi calculada a energia de ativação, que representa uma característica do processo de liberação de fármacos e determina a influência da temperatura e a taxa de liberação, usando a equação logarítmica de Arrhenius. O maior valor de energia de ativação foi da clorexidina em relação aos outros dois fármacos hidrossolúveis devido ao seu maior peso molecular (626 u). Maior liberação foi observada para os fármacos hidrossolúveis em água a 37°C em relação a 24°C, pois a temperaturas mais elevadas ocorre um aumento da difusão das moléculas e, especificamente para a clorexidina, este aumento foi de cinco vezes. Também foi obtido um aumento da taxa de liberação dos fármacos hidrossolúveis

quando avaliados em água/etanol a 24°C em relação ao meio contendo apenas água a 24°C. Isto foi explicado pelo molhamento induzido pelo etanol resultando em um alargamento dos canais na matriz do copolímero. A nistatina, quando avaliada isoladamente, apresentou a velocidade de liberação mais baixa. Quando este fármaco foi associado a um dos outros três, a sua e a velocidade de liberação de todos os demais fármacos foram aumentadas. O padrão de liberação de todos os fármacos em água/etanol a 24°C foi maior inicialmente (*burst effect*), seguido por uma liberação constante. Este padrão de liberação está relacionado à porosidade presente na matriz polimérica ou à liberação do fármaco superficial. Uma liberação controlada de um fármaco, sem o *burst* inicial, pode ser conseguida com a seleção apropriada dos polímeros e dos métodos de processamento. Em muitos protocolos terapêuticos, a velocidade de liberação deveria ser constante ou de ordem zero, significando que é independente do tempo. Os autores relataram, ainda, que o tamanho da partícula, sua geometria, a interação entre os fármacos e dos fármacos com a matriz e o comprimento e o tamanho dos poros/canais da matriz polimérica desempenham papéis fundamentais no deslocamento dos fármacos e a velocidade com que as moléculas dos fármacos difundem pela matriz pode ser aumentada pela diminuição de seu peso molecular.

No ano de 2007, Gong et al.⁸⁰ avaliaram a liberação de diacetato de clorexidina a partir de um polímero baseado em polietil metacrilato e tetrahidrofurfuril metacrilato utilizando fluido supercrítico de dióxido de carbono (CO₂) para preparar poros para o sistema de liberação. A escolha pelo diacetato de clorexidina foi devida a sua inibição efetiva contra cepas de *Candida* azole-resistentes. Foram avaliados 6 grupos: polímero padrão; polímero processado usando fluido supercrítico; polímeros com incorporação de 6% ou 12% em peso de diacetato de clorexidina; polímeros com incorporação de 6% ou 12% de diacetato de clorexidina, modificado por meio do fluido supercrítico. O diacetato de clorexidina foi misturado ao pó de PEMA. *N,N*-dimetil-*p*-toluidina foi, então, adicionada (2,5% em volume) ao monômero. A mistura foi colocada em matrizes (42 x 10 x 1 mm) e mantida a temperatura ambiente sob pressão de 2 bar. Para as amostras modificadas por fluido supercrítico, após o preparo convencional, os espécimes eram colocados em autoclave com CO₂ líquido a 50 bar. A autoclave foi mantida por 3 h a 40°C e 152 bar. A caracterização das

amostras foi feita por difração de raios X, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, porosimetria de mercúrio e os testes de liberação, por meio de espectroscopia UV-Vis. O equipamento de DSC foi calibrado com uma amostra pura de índio. Amostras de 6 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio e as análises foram feitas a uma taxa de aquecimento de 10°C/min sob uma atmosfera de nitrogênio seco de 30 a 200°C. No caso da liberação, cada espécime continha uma quantidade inicial de 50 mg de diacetato de clorexidina. O meio de dissolução consistiu de 100 mL de água deionizada estéril a 37°C a uma rotação de 20 rpm. Nos períodos de 2 e 6 h e 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11 e 14 dias, uma alíquota de 3 mL era removida e um igual volume de água era usado para completar o meio. As análises foram feitas a 254 nm e a concentração do fármaco na solução, calculada usando a lei de Bouguer-Lambert-Beer. A análise de difração de raios X revelou que no sistema convencional de adição da clorexidina, vários picos característicos ainda foram notados, sugerindo que parte do fármaco adicionado ainda estava na forma cristalina. No sistema modificado pelo fluido supercrítico, os picos característicos da clorexidina praticamente desapareceram, sugerindo que o fármaco estaria no estado amorfo dentro da matriz polimérica. O ponto de fusão da clorexidina cristalina foi de 157°C. Quando adicionada ao sistema convencional, a intensidade do pico de fusão da clorexidina diminuiu, sugerindo que a cristalinidade do fármaco foi reduzida. As temperaturas de transição vítrea (T_g) do sistema polimérico convencional foram ao redor de 72°C quando modificado por 12% de clorexidina e de 73°C, por 6% de clorexidina, as quais foram levemente inferiores à transição do sistema sem clorexidina (74°C). As curvas de DSC do sistema polimérico processado com fluido supercrítico apresentaram picos de pequena intensidade na faixa de 145°C-175°C. As T_g reduziram para 69°C e 61°C para as formulações com 6% e 12% de clorexidina, respectivamente. Isto sugere que a clorexidina estava na forma amorfa ou molecularmente dispersa no sistema polimérico. A redução da T_g pode ser explicada pela maior mobilidade das cadeias poliméricas devido à incorporação do fármaco e à porosidade aumentada da matriz após o processamento supercrítico. A espectroscopia infravermelha sugeriu uma interação de ponte de hidrogênio entre a clorexidina e o PEMA nas amostras. As análises em MEV mostraram que as amostras ficaram intumescidas e com grande quantidade de poros após o processamento com fluido supercrítico. Partículas circulares de clorexidina foram

visualizadas no sistema polimérico convencional e não foram visíveis no sistema supercrítico. A liberação do diacetato de clorexidina para o sistema polimérico com fluido supercrítico foi de ordem zero e sete vezes maior que o sistema convencional. Para as amostras convencionais, houve uma alta liberação inicial (*burst effect*) nas primeiras 24 h, seguida por uma liberação controlada até 14 dias, sendo que a quantidade de clorexidina liberada foi diretamente proporcional à quantidade adicionada nas amostras.

O efeito da adição dos surfactantes Tween 60 e Cremophor RH 40 na liberação de nistatina a partir de um sistema polimérico a base de etileno acetato de vinila e o efeito da concentração (2,5, 5, 7,5 e 10% em peso) dos fármacos nistatina, diacetato de clorexidina e aciclovir incorporados ao copolímero sobre sua taxa de liberação foram estudados por Tallury et al. em 2007.⁸¹ A incorporação dos fármacos ao polímero foi feita pela técnica da evaporação de solvente. Para o experimento do efeito dos surfactantes, as proporções de nistatina:surfactantes utilizadas foram de 1:1, 1:2 e 1:3 e a quantidade de nistatina adicionada ao polímero foi de 2,5% em peso. Espécimes (n=3; 30 x 30 x 0,8 mm) foram confeccionados e armazenados em 10 mL de água destilada (efeito da concentração) ou de tampão fosfato salino (efeito do surfactante) por 12-14 dias. O meio foi trocado e analisado diariamente por espectrofotometria UV a 306, 257,5 e 253 nm para a nistatina, o diacetato de clorexidina e o aciclovir, respectivamente, usando curvas de calibração. Os surfactantes não exibiram absorvância na região de 200-400 nm e, portanto, não interferiram na análise da nistatina. A quantidade de surfactante liberado foi determinada em cromatografia líquida de alta eficiência: coluna C18 150 x 3,9 mm, detector evaporativo por espalhamento de luz, eluição gradiente 70:30 por 5 min e 85:15 por 11 min de água/acetonitrila a um fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A solubilidade dos fármacos foi determinada, individualmente, em 5 mL de água pela agitação da solução saturada por 24 h a 37°C. O excesso do fármaco foi filtrado e a solução foi analisada em UV. A taxa de liberação da nistatina em tampão fosfato foi de 0,87 µg/cm² ao dia. As proporções de 1:2 e 1:3 de ambos os surfactantes resultaram em aumento na liberação de nistatina, sendo que o Tween 60 facilitou mais a liberação de nistatina que o Cremophor. Quando moléculas de surfactantes são dissolvidas em água em concentrações acima da crítica micelar

formam micelas. Uma propriedade importante das micelas é a habilidade de aumentar a solubilidade de substâncias pouco solúveis em água. Também é possível que o surfactante reduza a tensão interfacial entre o polímero e o meio de dissolução, aumentando a dispersabilidade da matriz contendo fármaco permitindo sua liberação. Outra possibilidade é a de o surfactante agir causando a entrada do fluido na matriz e, na sequência, ele dissolve e cria canais por onde o fármaco pode ser liberado. O aumento da concentração de surfactantes aumenta o número de micelas, que aumenta a porosidade do polímero facilitando a difusão do fármaco. A concentração micelar crítica do Tween 60 foi relatada como sendo 30 µg/mL. Também foi observado que a liberação dos fármacos aumentou com o aumento da concentração previamente adicionada ao copolímero. A nistatina apresentou a mais baixa taxa de liberação que foi associada a sua menor solubilidade em água. As solubilidades obtidas para clorexidina, aciclovir e nistatina foram 20, 2,67 e 0,715 mg/mL, respectivamente. Apesar disso, o aciclovir apresentou taxa de liberação maior que a clorexidina e isto foi explicado pelos outros fatores que também influenciam a liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas como sua solubilidade relativa na matriz, sua interação com o polímero e sua difusão relativa através dos canais formados no polímero.

Amin et al. (2009)⁸² investigaram a liberação do fluconazol (10%), da clorexidina (10%) e da combinação destes fármacos (5%:5%) quando incorporados a uma resina acrílica autopolimerizável para bases de próteses. O efeito da liberação dos agentes antifúngicos sobre o crescimento de *C. albicans* também foi avaliado. Os corpos de prova (3,8 x 1 mm) obtidos foram imersos em 60 mL de água destilada por duas, quatro, seis e doze horas, um, dois e quatro dias, uma, duas, três e quatro semanas. A análise da liberação dos fármacos foi realizada a partir da água de imersão dos corpos de prova por meio de cromatografia líquida de alta eficiência usando os seguintes parâmetros: fase móvel acetonitrila/tampão fosfato 0,001 M (25:75) e fluxo a 1 mL/min, coluna C18 de 25 x 4,6 cm e tamanho de partícula de 5 µm, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 210 nm. Após cada período, alíquotas da água de imersão eram retiradas e o meio, substituído. As alíquotas eram dispensadas em orifícios confeccionados em placas de Sabouraud semeadas com *C. albicans* e a inibição do crescimento fúngico foi

avaliada por meio da mensuração dos halos formados. Os resultados evidenciaram uma liberação de forma contínua e, em consequência disso, uma inibição do crescimento de *C. albicans* durante 28 dias tanto dos fármacos isolados como em associação incorporados à resina acrílica.

Ryalat et al.⁵⁸ estudaram em 2011 a liberação de clorexidina incorporada a uma resina acrílica autopolimerizável a base de poli metilmetacrilato e o efeito do fármaco liberado sobre o crescimento de *C. albicans*. Corpos de prova (3,8 x 1 mm) foram confeccionados e levados a uma panela pneumática para polimerização a uma pressão de 2 bar a 55°C por 15 min. Corpos de prova com adição de clorexidina 10% em peso ao pó do material também foram confeccionados nas mesmas condições. Para as análises de liberação, foram confeccionados cinco corpos de prova para cada grupo experimental. Estes espécimes foram colocados individualmente em frascos com 5 mL de água duplamente destilada a 37°C sob leve agitação constante. Após uma hora, cento e cinquenta µL de uma solução contendo o padrão interno (p-metil fenol a 160 nmol/mL) foram adicionados. Em seguida, vinte µL desta mistura foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência. Este procedimento foi repetido após 24 h, dois, três, quatro, cinco, seis e sete dias e cada semana durante quatro semanas. As condições de análise em cromatografia foram: eluição isocrática utilizando a fase móvel de acetonitrila/tampão fosfato 0,01 M (25:75%) a um fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, coluna BDS-C18 (25 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm), detecção ultravioleta a 210 nm. As soluções estoque e analíticas foram preparadas com a dissolução do fármaco em água, tendo sido também adicionado na solução analítica o padrão interno. O tempo de retenção da clorexidina nestas condições foi de 4,86 min. Para as análises microbiológicas, uma cepa resistente de *C. albicans* foi isolada de um paciente e uma cepa referência (ATCC 90028) foi usada como controle. Durante os experimentos, as cepas foram plaqueadas duas vezes em ágar Sabouraud por 24 h a 35°C para garantir sua viabilidade e pureza. O inóculo foi preparado coletando-se cinco colônias de 1 mm, as quais foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,85%. A turvação da suspensão foi ajustada a 0,5 da escala McFarland. Vinte µL dos eluat dos corpos de prova contendo ou não clorexidina foram colocados nas placas de cultura incubadas a 35°C por 72 h. O experimento da difusão em ágar foi

repetido cinco vezes para cada corpo de prova. A liberação de clorexidina foi alta inicialmente durante dois a sete dias, seguida por uma liberação controlada até os 28 dias de ensaio, sendo que após 24 h haviam sido liberados 606 µg/mL do fármaco. A maior liberação inicial da clorexidina em água deve-se a um processo de difusão concentração-dependente que consistiu de duas fases. A primeira fase rápida resulta de uma liberação do fármaco superficial obedecendo a lei de Fick. A liberação subsequente controlada pode ser o resultado de um processo complexo, envolvendo a formação de fluidos ao redor das partículas do fármaco e a interação destes fluidos com o mecanismo de absorção de água do polímero. Além de a liberação poder ter ocorrido a partir de fendas e porosidades formadas no polímero pelas forças osmóticas consequentes da adição do fármaco ao material. Os eluatos dos corpos de prova contendo clorexidina a 10% demonstraram atividade antifúngica durante todo o período do experimento e os eluatos controles não inibiram o crescimento de *C. albicans*.

Salim et al. (2012)⁵⁵ incorporaram fluconazol puro, em pó a partir de cápsulas ou clorexidina em um polímero de polietil metacrilato e tetrahidrofurfuril metacrilato com o objetivo de avaliar a atividade antifúngica contra espécies de *Candida* e a liberação destes fármacos durante 28 dias. Os corpos de prova (n=5; 40 x 0,5 mm) foram confeccionados a partir da mistura de 1 g de polietil metacrilato e 0,6 mL do monômero (grupo controle) e, para os espécimes modificados, dez por cento em peso do pré-polímero foram substituídos por 10% de um dos fármacos e, no caso do fluconazol a partir de cápsulas, foram adicionados 25% (equivalentes aos 10% do fluconazol puro) e, então, polimerizados a temperatura ambiente por 15 min. Os discos foram incubados em 20 mL de água destilada estéril a 37°C por 28 dias, sendo que o meio foi agitado levemente três vezes ao dia, coletado e substituído nos períodos de 24 h, três, sete, 14, 21 e 28 dias. A liberação e a atividade antifúngica foram avaliadas com a técnica do bioensaio. Uma suspensão da cepa de *C. kefyr* San Antonio ou de *C. albicans* (ATCC 90028) foi misturada em ágar com meio YNB com glicose (1%) e citrato trissódico (0,59%) e colocada em placas de cultura. Poços de 8 mm de diâmetro foram, então, removidos do ágar. Duas diluições em série de fluconazol puro e de clorexidina foram preparadas e essas concentrações conhecidas foram usadas como padrão e controle interno.

Triplicatas dos padrões, duplicatas dos controles internos e duplicatas de cada eluato dos corpos de prova nos seis períodos em análise foram colocadas nos poços. Duplicatas do monômero e do pré-polímero diluídas em dimetil sulfóxido também foram testadas. Após incubação durante a noite a 37°C, os halos de inibição foram mensurados com o auxílio de um paquímetro digital. Os halos médios de inibição dos fármacos padrões foram plotados, gerando uma curva de calibração. Esta curva foi utilizada para calcular as concentrações dos fármacos nos controles internos e liberados dos espécimes. Para preencher o controle de qualidade do estudo, os controles internos deveriam estar dentro de 20% da concentração esperada para cada fármaco. O bioensaio foi validado de acordo com os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e reprodutibilidade. O limite de detecção foi calculado como o menor halo de inibição detectável e um coeficiente de variação menor que 20% foi aceitável. Uma linearidade maior que 0,99 foi aceita e a reprodutibilidade do método foi validada a partir da reanálise de 30% das amostras em dias diferentes. Um teste de susceptibilidade antifúngica da clorexidina e do fluconazol puro foi realizado em 46 cepas isoladas de *Candida*, sendo 32 de *C. albicans*, 13 de *C. glabrata* e uma de *C. kefyr*. As CMI foram determinadas para ambos os fármacos usando a metodologia da microdiluição. Duas diluições seriadas de fluconazol (0,125-2048 mg/L) e clorexidina (0,1-50 mg/L) foram preparadas em água destilada estéril e um inóculo de 1×10^3 microrganismos/mL foi usado. Após 48 h de incubação a 37°C, o crescimento dos microrganismos em cada poço foi medido espectrofotometricamente a 490 nm. Para o fluconazol, a CMI foi a menor concentração que reduziu 50% do crescimento em relação ao controle (sem fármaco). E, para a clorexidina, a CMI foi a concentração mais baixa que reduziu 80% do crescimento de *Candida*. Os resultados mostraram que um total de 53% (190 mg/L) de clorexidina, 38,5% (120 mg/L) de fluconazol puro e 13,2% (50 mg/L) de fluconazol puro a partir de cápsulas foram liberados dos discos durante 28 dias. Para todos os fármacos, houve uma alta taxa de liberação inicial seguida por uma liberação reduzida, porém controlada durante todo o período. Da concentração total liberada, 71,8% da clorexidina, 75,1% do fluconazol puro e 70,5% do fluconazol a partir de cápsulas foram liberados durante a primeira semana de armazenamento. A liberação lenta foi atribuída a uma provável difusão a partir do interior do polímero via formação de gotículas de água ao redor do fármaco, concentração-dependente. A liberação de clorexidina foi significativamente maior que a de fluconazol. Os limites

de detecção foram de 6,25 e 50 mg/L para o fluconazol e para a clorexidina, respectivamente. As CMI para isolados de *C. albicans* foram de 0,61 mg/L e 5,03 mg/L; de *C. glabrata* foram de 30,34 mg/L e 4,78 mg/L e de *C. kefyr* foram de 0,5 mg/L e 0,78 mg/L para o fluconazol e para a clorexidina, respectivamente. A quantidade liberada das amostras na última semana excedeu as CMI da maioria dos isolados para o fluconazol e de todos os isolados para a clorexidina. O sistema polimérico foi caracterizado como tendo capacidade distintiva de absorção de água e de liberação controlada de fármaco.

2.3 PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS

O trabalho de Douglas e Clarke (1975)⁴⁹ avaliou propriedades físicas e mecânicas de três materiais macios (Coe-Comfort, Coe-Soft e Coe-Supersoft) com incorporação de nistatina 750.000 UI. Os corpos de prova do reembasador resiliente semipermanente Coe-Supersoft foram confeccionados em dois diferentes ciclos de polimerização: a 75°C por 6 h + 30 min a 1 h a 100°C ou a 40°C por 14 h, uma vez que, segundo os autores, esta temperatura mais baixa é mais compatível com a presença de nistatina no material. Para o teste de absorção de água, corpos de prova (n=2; 50 x 3,5 mm) com e sem adição de nistatina foram secos com pentóxido de fósforo até a obtenção de massa estável. Na sequência, foram imersos em água a 37°C e pesados em intervalos durante 60 dias. A resistência de união foi testada a 5 cm/min utilizando corpos de prova (n=5; 6 x 6 mm), que foram seccionados ao meio e, então, unidos usando um material macio apropriado. O teste de dureza foi feito com uma carga primária de 1 Gm por 15 s, seguida por 10 Gm por 30 s utilizando corpos de prova (n=2) de 3,5 mm de espessura que foram imersos em água a 37°C e a avaliação feita por 50 dias. Para avaliar a tensão em compressão, corpos de prova (3/4 de polegada de altura e 1/2 polegada de diâmetro) foram incluídos em gesso e armazenados em água a 37°C por sete dias de acordo com a especificação nº 11 da ADA. Os materiais modificados apresentaram-se macios e, segundo os autores, os resultados das propriedades avaliadas provavelmente não acarretariam redução de performance clínica. As alterações mais significantes dos materiais modificados foram observadas na propriedade de absorção de água, tendo sido mais significativa no condicionador de tecido Coe-Comfort seguido pelo

reembasador resiliente temporário Coe-Soft. Entretanto, de acordo com os autores, isto poderia aumentar a efetividade farmacológica destes materiais pela facilitação da liberação de nistatina para as superfícies teciduais.

Addy e Handley,⁸³ em 1981, avaliaram algumas propriedades de uma resina acrílica termopolimerizável (Croform) e um condicionador de tecido (Visco-gel) após a incorporação de acetato de clorexidina a 2, 5 ou 10% ao pó dos materiais. Grupos controles sem adição de clorexidina foram obtidos nas condições avaliadas. Para a análise de perda de massa e absorção de água, corpos de prova circulares (25 x 3 mm) foram submetidos a secagem até atingirem massa constante e depois, imersos em água destilada para serem pesados três vezes por semana durante 87 dias. Para os testes de dureza, resistência à flexão e módulo de elasticidade, foram utilizados corpos de prova nas dimensões de 70 x 2,5 x 10 mm. Para a resina acrílica (controle), a porcentagem de ganho de massa foi mais acentuada nos dez primeiros dias e, após 30 dias, praticamente não houve mais alterações. Nos corpos de prova de resina acrílica contendo clorexidina, o ganho de massa máximo também ocorreu nos dez primeiros dias, sendo verificada perda gradativa de massa após esse período. Todos os corpos de prova do condicionador de tecido apresentaram um progressivo aumento de massa ao longo do período de avaliação, apesar de o aumento ter sido mais considerável durante 60 dias. A dureza e o módulo de elasticidade foram significativamente reduzidos na resina acrílica com adição de clorexidina. De acordo com os autores, as mudanças observadas foram coerentes com o padrão de incorporação de clorexidina na matriz polimérica. Apesar dos resultados, a incorporação de clorexidina nos materiais avaliados foi considerada válida para reembasamento de próteses existentes.

No mesmo ano, Thaw et al.⁸⁴ realizaram um estudo para avaliar o efeito da adição de clorexidina ou de água sobre o módulo de elasticidade e a dureza de uma resina acrílica autopolimerizável (Croform). Um grupo sem adição de fármaco ou de água também foi obtido para controle. A água foi adicionada ao monômero do material nas proporções volumétricas de 10, 20 e 30%. O acetato de clorexidina a 10% foi adicionado ao pó do material. Blocos (70 x 45 x 3,5 mm) foram polidos

(#600) até que a espessura de 2,5 mm fosse atingida. Cada bloco foi seccionado para a obtenção de corpos de prova com dimensões de 10 x 2,5 mm (n=10). Os resultados demonstraram que a dureza e o módulo de elasticidade da resina acrílica reduziram significativamente com a adição de água e clorexidina. Essa diminuição se mostrou progressiva com o aumento volumétrico da água adicionada. Concluiu-se, portanto, que a incorporação de clorexidina ou de água alterou as propriedades mecânicas da resina acrílica autopolimerizável, o que não contraindica seu uso pela vantagem no que se refere à liberação do fármaco.

Schneid (1992)¹⁷ investigou a viabilidade de um sistema de liberação de quatro agentes antifúngicos (clorexidina, clotrimazol, fluconazol e nistatina) para o tratamento da estomatite protética. Os antifúngicos foram adicionados ao material nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg para a clorexidina, o clotrimazol e o fluconazol e de 125, 250 e 500 mg para a nistatina. Os fármacos foram incorporados ao líquido, sendo a manipulação com o pó realizada de acordo com as instruções do fabricante. Como controle, utilizou-se o material sem adição de fármaco. Os corpos de prova constituíram-se de discos confeccionados com uma camada de 6 mm do condicionador de tecido Lynal sobre 2 mm de resina acrílica termopolimerizável para base de prótese. A mensuração da dureza Shore A foi realizada diariamente, durante 14 dias. Nesse período, os corpos de prova ficaram armazenados em saliva artificial a 37°C. Para os testes de resistência à tração, foram confeccionadas barras cilíndricas do condicionador de tecido (5 mm) com resina acrílica aderida às suas extremidades. Para a avaliação da atividade antifúngica, placas de Petri continham uma camada do condicionador de tecido impregnado com um dos antifúngicos, coberta por outra camada de ágar Sabouraud. Diariamente, por 16 dias, e semanalmente, por 42 dias, essas amostras eram inoculadas com suspensões de *C. albicans* contendo 10^2 células/mL para o fluconazol ou 10^5 células/mL para os demais fármacos. Avaliações quantitativas do crescimento fúngico eram realizadas cinco dias após cada inoculação. A dureza de todos os grupos experimentais aumentou proporcionalmente com a concentração de fármaco e o tempo de avaliação, entretanto, os valores obtidos foram considerados aceitáveis clinicamente (Shore A $\leq$ 49). As médias de resistência à tração aumentaram em todos os grupos experimentais e foram significativamente superiores às obtidas com o controle.

Todas as falhas foram caracterizadas como coesivas. Os fármacos testados demonstraram inibição do crescimento de *C. albicans*, o que não ocorreu no grupo controle. Essa inibição foi mais acentuada com maiores concentrações dos fármacos, sendo reduzida ao longo do tempo de avaliação. Os autores concluíram que os quatro antifúngicos testados poderiam ser combinados com o condicionador de tecido para inibição fúngica. Foi sugerido que a modificação do material pelos fármacos não alterou clinicamente sua dureza e que, apesar de ter aumentado sua resistência à tração, não interferiu com a união à resina acrílica termopolimerizável.

Em 2006, Urban et al.¹⁸ avaliaram a resistência à tração de um condicionador de tecido (Dura Conditioner) com (500.000 e 1.000.000 UI) e sem incorporação de nistatina, após 24 h e sete dias de armazenagem em água destilada a 37°C. Corpos de prova (n=7) em forma de halteres com área útil central retangular (33 x 6 x 3 mm) foram submetidos aos testes de tração a uma velocidade de 40 mm/min. Diferenças significativas foram observadas entre os períodos de armazenagem, mas não entre os grupos controle e os experimentais. Comparada ao período de 24 h, a imersão em água por sete dias causou redução na resistência à tração do material, independentemente da adição de nistatina. De acordo com as condições estudadas, foi possível concluir que a incorporação de nistatina em até 1.000.000 UI não afetou a resistência à tração do material.

O padrão de incorporação de fármacos antifúngicos em um condicionador de tecido (Softone) foi avaliado por Urban et al. (2009)²⁸ por meio de MEV, além da utilização de espectroscopia por energia dispersiva de raios X com a finalidade de identificar os antifúngicos (nistatina, miconazol, cetoconazol e diacetato de clorexidina) dispersos no material. Ao pó do material, foram acrescentadas duas concentrações de cada fármaco: nistatina (500.000 e 1.000.000 UI), miconazol (125 e 250 mg), cetoconazol (100 e 200 mg) e diacetato de clorexidina (5% e 10%). Corpos de prova (n=5; 36 x 7 x 6 mm) modificados ou não (grupo controle) pela adição de fármaco foram então confeccionados a partir da adição do líquido e manipulação de acordo com as instruções do fabricante. Três áreas aleatórias dos corpos de prova de cada grupo foram selecionadas para as análises. Os corpos de

prova contendo nistatina apresentaram distribuição uniforme de partículas com formas e tamanhos aleatórios, variando de 10 a 50 μm . As partículas de miconazol dispersas no material se mostraram irregulares, com dimensões entre 25 e 50 μm , enquanto as de cetozonazol eram esféricas e uniformes, variando entre 10 e 25 μm . A análise em MEV exibiu partículas disformes de clorexidina de até 50 μm . A presença de íons de enxofre e cálcio na matriz do condicionador de tecido foi observada na análise em espectroscopia do grupo controle e, conseqüentemente, em todos os demais grupos de estudo. Íons cloro foram também identificados nos grupos contendo miconazol e clorexidina. De acordo com os autores, a atividade desejável de um antifúngico adicionado a um sistema polimérico depende da habilidade de liberação das partículas desse fármaco. Dentre os fatores relacionados à liberação, os autores listaram e discutiram os seguintes: tamanho de partícula, peso molecular, distribuição no interior da matriz, concentração adicionada e as propriedades de difusão e dissolução do fármaco. Com relação à matriz, foram relatados e discutidos a micromorfologia, permeabilidade, porosidade e interação com o fármaco como outros fatores que interferem na sua liberação. O condicionador de tecido modificado demonstrou diferenças quanto à distribuição e tamanho das partículas dos fármacos antifúngicos adicionados à sua matriz. Foram sugeridos outros estudos que discriminassem os fatores e as características mais importantes que influenciam na liberação do fármaco a partir da matriz polimérica.

O estudo de Bueno et al. (2012)⁶¹ avaliou a dureza Shore A de dois materiais macios temporários (Trusoft e Softone) para base de prótese modificados pela incorporação de CMLs para o biofilme de *C. albicans* (SC 5314) de cinco fármacos utilizados no tratamento de estomatite protética. Corpos de prova (n=8; 36 x 7 x 6 mm) dos materiais foram confeccionados sem (controle) ou com adição dos fármacos em suas CMLs (nistatina = 0,032 g; diacetato de clorexidina = 0,064 g; cetozonazol = 0,128 g; miconazol = 0,256 g e itraconazol = 0,256 g para cada grama do pó dos materiais). Após armazenamento em água destilada a 37°C por 24 h, sete e 14 dias, foram realizados os testes de dureza Shore A. A adição dos antifúngicos em ambos os materiais não alterou os valores de dureza ou resultou na sua diminuição em relação ao controle, exceto para a incorporação de miconazol ao Softone, que demonstrou significativamente maiores médias após 14 dias. Em todas

as condições, as médias de dureza do Softone foram inferiores às aquelas observadas para o Trusoft. Os autores concluíram que a adição de todos os fármacos testados, exceto o miconazol no Softone, não causou alterações deletérias à dureza dos materiais no período avaliado.

Em 2012, Galitesi et al.⁵⁹ avaliaram a resistência à tração de um reembasador resiliente temporário (Trusoft) modificado pela adição de fármacos antifúngicos nas suas CMI's para o biofilme de *C. albicans* (SC 5314). Corpos de prova em forma de halteres (n=7) com área de secção útil transversal central (33 x 6 x 3 mm) foram confeccionados. Os grupos avaliados foram: controle (sem adição de fármaco) ou nistatina = 0,032 g; diacetato de clorexidina = 0,064 g e cetoconazol = 0,128 g adicionados para cada grama do pó do material. Os corpos de prova foram imersos em água destilada a 37°C por 24 h, sete e 14 dias e, então, testados em tensão em máquina de ensaios universal a 40 mm/min para a determinação da resistência à tração e porcentagem de alongamento. Para todos os grupos, não houve diferença significativa nas médias de resistência à tração para o Trusoft após 14 dias de avaliação em comparação às 24 h. A única diferença significativa para as médias de resistência à tração entre os grupos foi observada com o cetoconazol em sete dias em relação aos demais períodos. Similarmente, o material modificado com cetoconazol demonstrou maiores porcentagens de alongamento após 14 dias que em 24 h. Nas condições in vitro testadas, foi concluído que em comparação ao controle, a adição das CMI's de clorexidina e nistatina no Trusoft não resultou em efeitos deletérios em suas propriedades de resistência à tração e alongamento em até 14 dias de imersão em água.

O efeito da incorporação de fármacos antifúngicos nas suas CMI's para o biofilme de *C. albicans* (SC 5314) na rugosidade de superfície de materiais macios temporários para base de próteses foi avaliado por Neppelenbroek et al. (2012).⁶³ Corpos de prova (n=8; 36 x 7 x 6 mm) dos materiais macios (Softone e Trusoft) foram confeccionados sem (controle) ou com incorporação dos fármacos em suas CMI's (nistatina = 0,032 g; diacetato de clorexidina = 0,064 g; cetoconazol = 0,128 g; miconazol = 0,256 g e itraconazol = 0,256 g para cada grama dos materiais). Após

armazenamento em água destilada a 37°C por 24 h, sete e 14 dias, os corpos de prova foram submetidos à análise da rugosidade de superfície em rugosímetro. A incorporação de nistatina aos dois materiais, de diacetato de clorexidina ao Trusoft e de cetoconazol ao Softone não alterou os valores de rugosidade em relação ao controle após sete e 14 dias. Nesses períodos, o itraconazol aumentou a rugosidade dos materiais. Em relação às 24 h iniciais, o período de 14 dias mostrou que a rugosidade com a adição de nistatina, miconazol e cetoconazol foi reduzida para o Trusoft e não apresentou alteração para o Softone. Foi concluído que, no período final de avaliação, a adição de nistatina, miconazol e cetoconazol em ambos os materiais e de diacetato de clorexidina no Trusoft não resultou em efeitos adversos à rugosidade de superfície.

Ainda em 2012, Neppelenbroek et al. (2012)⁶⁰ avaliaram o efeito da incorporação de fármacos antifúngicos nas suas CMLs ao biofilme de *C. albicans* (SC 5314) sobre a resistência à tração e alongamento de um condicionador de tecido (Softone). Foram confeccionados corpos de prova (n=7) em forma de halteres com área útil de secção transversal central de 33 x 6 x 3 mm. Os grupos avaliados consistiram de corpos de prova de Trusoft sem (controle) ou com a incorporação das CMLs de três fármacos: nistatina = 0,032 g; diacetato de clorexidina = 0,064 g e cetoconazol = 0,128 g (para cada grama do material). Os corpos de prova foram imersos em água destilada a 37°C por 24 h, sete e 14 dias e, então, testados em tensão em máquina de ensaios universal a 40 mm/min para a determinação da resistência à tração e porcentagem de alongamento. Para todos os grupos, a resistência à tração do Softone após 14 dias foi significativamente maior que em 24 h. Independentemente da adição de fármaco, os corpos de prova após 14 dias demonstraram significativamente maiores porcentagens de alongamento que em 24 h e sete dias de imersão em água. Os grupos modificados por diacetato de clorexidina e nistatina apresentaram maiores porcentagens de alongamento, seguidos respectivamente pelo grupo modificado pelo cetoconazol e o controle. Foi concluído que em relação ao controle, a adição de todos os fármacos em suas CMLs não promoveu efeitos deletérios na resistência à tração do material macio ao longo do período de avaliação. Dentre as condições avaliadas, a incorporação de diacetato

de clorexidina e nistatina no Softone resultou em maiores porcentagens de alongamento.

Alcântara et al. (2012)⁶⁴ avaliaram o efeito da adição de antifúngicos na resistência da união ao descolamento entre um material macio temporário (Soft Comfort) e uma resina acrílica termopolimerizável para base de prótese (QC 20). Os corpos de prova da resina acrílica (n=9; 75 x 10 x 3 mm) foram obtidos e armazenados em água destilada a 37°C por 48 h. As concentrações de fármacos (nistatina 500.000 e 1.000.000 UI; miconazol 125 e 250 mg; cetoconazol 100 e 200 mg e diacetato de clorexidina 5% e 10%) foram incorporadas ao pó do material antes da adição do líquido. Um grupo sem a adição de antifúngicos foi utilizado como controle. Corpos de prova reembasados (n=9; 75 x 10 x 6 mm) foram imersos em água destilada a 37°C por 24 h para então serem submetidos ao teste de resistência da união ao descolamento a 180° sob velocidade de 10 mm/min. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de estudo avaliados. Falhas coesivas do material macio foram predominantemente observadas. De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a resistência da união ao descolamento entre a resina de base e o material macio testados não foi adversamente afetada pela adição dos agentes antifúngicos.

Os efeitos sobre o grau de conversão e a estabilidade de cor de um polímero a base de polietil metacrilato e tetrahidrofurfuril metacrilato modificado pela adição de clorexidina ou fluconazol foram estudados por Salim et al.⁸⁵ em 2012. Os materiais foram preparados com a mistura de 1 g de polietil metacrilato (contendo <1% de peróxido de benzoila) e 0,6 mL do monômero (contendo *N,N*-dimetil-p-toluidina). Para as amostras impregnadas, os fármacos foram misturados ao pó do material e o líquido então adicionado. 10% em peso do pré-polímero foram substituídos por clorexidina, fluconazol puro ou por 25% de fluconazol em pó a partir de cápsulas (que correspondiam a 10% do fluconazol puro). Para avaliar o grau de conversão, amostras (n=10) foram misturadas e agitadas até a fase plástica e colocadas na mesa de uma unidade de reflectância total microatenuada do equipamento de espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier e as

análises foram feitas imediatamente (amostra não polimerizada) e após 24 h (amostra polimerizada). A varredura foi feita na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , quatro cm^{-1} de resolução, trinta e dois scans e a mensuração do grau de conversão, a partir da relação entre as bandas alifática a 1635 cm^{-1} e carbonila a 1720 cm^{-1} , como padrão interno, antes e após a polimerização. Corpos de prova (n=5; 10 x 1 mm), nos mesmos grupos anteriores, foram mantidos a temperatura ambiente por 15 min e então armazenados em água destilada estéril a 37°C por 24 h para polimerização. A cor dos espécimes foi avaliada espectrofotometricamente após 24 h e após 28 dias de armazenamento em água de acordo com o sistema CIE L*a*b*. As alterações de cor também foram avaliadas usando as unidades NBS (*National Bureau of Standards*). Os resultados mostraram maiores porcentagens de grau de conversão para amostras sem fármaco comparadas com aquelas modificadas. Isto pode ser atribuído a uma polimerização incompleta pela presença das partículas do fármaco. Os valores mais baixos foram observados para o fluconazol proveniente das cápsulas o que foi relacionado à presença de excipientes no pó das cápsulas e à necessidade de adição de uma maior quantidade de pó para equivaler à quantidade ativa do fármaco, resultando na quebra da estrutura polimérica e interferência com a propagação das cadeias. No caso da clorexidina, pode ter havido uma influência na eficiência da polimerização provavelmente devido à protonação da molécula. Os deslocamentos observados nos picos correspondentes ao grupo carbonila das amostras impregnadas em relação às controles podem ser atribuídos a interações de ponte de hidrogênio com grupos N-H da clorexidina e grupos O-H do fluconazol. Embora sem significância estatística, o mais baixo grau de conversão da clorexidina em relação ao fluconazol puro foi associado ao maior peso molecular da clorexidina. Os corpos de prova controles não tiveram mudanças significativas na cor quando comparados com os grupos de adição de fármacos. As mudanças de cor foram atribuídas à absorção de água, composição química e ao monômero residual. A menor estabilidade de cor das amostras contendo fluconazol em pó a partir de cápsulas foi relacionada à alta absorção de água e maior quantidade de monômero residual devido à maior quantidade de pó adicionada ao material. Foi encontrada uma forte correlação negativa entre grau de conversão e estabilidade de cor. Os autores concluem que o polímero em estudo pode ser considerado um sistema biocompatível de liberação de fármacos e que, embora as alterações tenham sido

significativas, o impacto dos resultados pode não ser de significância clínica, visto que os valores estavam dentro dos aceitáveis pela ISO.

No mesmo ano, Salim et al.⁸⁶ realizaram um estudo para avaliar o efeito da incorporação de clorexidina, fluconazol puro ou fluconazol em pó obtido a partir de cápsulas sobre a absorção de água e a resistência da união ao cisalhamento com uma resina para base de prótese de uma matriz polimérica a base de polietil metacrilato e tetrahidrofurfuril metacrilato. Foram confeccionados cilindros (n=8; 16 x 25 mm) de resina termopolimerizável que, após 24 h, foram polidos (#600) e receberam aplicação de acetona e de adesivo que foi deixado secar por 30 min. Discos (n=8; 8 x 3 mm) de polietil metacrilato/tetrahidrofurfuril metacrilato (1 g:0,6 mL) foram preparados e deixados polimerizar por 24 h. Para os discos impregnados com fármacos, dez por cento do pó do pré-polímero foram substituídos por 10% em peso de clorexidina, fluconazol puro ou 25% de fluconazol em pó a partir de cápsulas (correspondentes a 10% do fluconazol puro). Os corpos de prova foram testados imediatamente após 24 h da polimerização completa do material autopolimerizável ou após armazenamento em 100 mL de água destilada a 37°C por 28 dias. Foi usada uma carga de 500 N e velocidade de 1 mm/min e as falhas foram examinadas visualmente e avaliadas por dois examinadores. Os corpos de prova (n=5; 40 x 0,5 mm) para absorção de água foram feitos da mesma forma que para resistência ao cisalhamento e deixados polimerizar por 15 min. Os espécimes foram armazenados em dessecador contendo sílica gel anidra a 37°C e pesados diariamente em balança de precisão (0,01 mg) até que a massa estivesse constante e que a diferença entre as pesagens num intervalo de 24 h fosse inferior a 0,1 mg. Em seguida, foram imersos em 100 mL de água destilada estéril a 37°C e as mensurações das massas foram feitas diariamente durante a primeira semana, semanalmente durante dois meses e mensalmente até seis meses. Em cada uma dessas mensurações, os espécimes eram removidos da água, secos com papel filtro até a eliminação da umidade visível e com jato de ar por 15 s, pesados e novamente imersos em água. Os resultados mostraram que a impregnação com os fármacos afetou a absorção de água e a união à resina termopolimerizável do sistema polimérico. A resistência ao cisalhamento foi maior para o grupo controle em relação aos experimentais nos dois períodos em avaliação; esta propriedade foi reduzida

para todos os grupos após 28 dias de armazenamento e todos os valores foram superiores aos recomendados ($> 0,44$ MPa). A menor resistência dos grupos impregnados pode estar relacionada à presença dos fármacos os quais poderiam romper a estrutura polimérica e introduzir mais espaços e menor homogeneidade na matriz polimérica, potencialmente enfraquecendo a união com a resina de base. Além disso, estes fármacos poderiam afetar a polimerização, impedindo a propagação das cadeias. As falhas foram adesivas em todos os grupos, indicando que a união é mais fraca que a resistência do material experimental. A redução da resistência ao cisalhamento com o tempo de imersão é explicada pela capacidade de absorção de água do polímero, visto que os autores encontraram uma forte correlação negativa entre absorção de água e resistência ao cisalhamento. Houve um aumento da absorção de água no polímero impregnado que pode ter sido devido à formação de gotículas em torno das partículas do fármaco que aumentam conforme a água entra no material pelo gradiente osmótico entre as gotículas internas e o meio externo. Outro fator que pode ter desempenhado um papel na absorção de água é a solubilidade do fármaco adicionado. Uma vez que a clorexidina apresenta maior solubilidade em água e tem um peso molecular duas vezes maior que o fluconazol, quando as partículas da clorexidina difundem para a água, deixam poros maiores no material, que, por sua vez, absorve mais água. A absorção da água poderia ser benéfica para o sistema polimérico já que resultaria em uma facilitação da liberação do fármaco, embora a possibilidade de liberação de monômero residual também aumente. Neste aspecto, os autores encontraram uma forte correlação positiva para todos os fármacos entre absorção de água e liberação in vitro, avaliada em um estudo anterior. Ainda, houve uma correlação linear entre a alteração de massa e a raiz quadrada do tempo de imersão nos estágios iniciais da avaliação da absorção de água refletindo uma difusão controlada. Os autores afirmam que a absorção de água em fluidos como a saliva é muito mais baixa do que em água destilada como resultado da osmolaridade aumentada que limita a absorção. Em consequência disso, a resistência ao cisalhamento poderia ser ainda mais alta na cavidade oral que na água destilada in vitro.

Em 2013, Pellissari et al.⁶⁵ avaliaram o efeito da incorporação dos fármacos nistatina, miconazol, cetoconazol, itraconazol e diacetato de clorexidina nos

materiais macios temporários Softone e Trusoft sobre a resistência da união ao descolamento a uma resina acrílica para base de prótese. Os grupos avaliados foram: S e T (controles); Ni-S; Ni-T; Mc-S; Mc-T; Ce-S; Ce-T; It-S; It-T; Clx-S; Clx-T, sendo que os fármacos foram adicionados em suas CMI's (0,032; 0,256; 0,128; 0,256 e 0,064 g para nistatina, miconazol, cetoconazol, itraconazol e diacetato de clorexidina, respectivamente, para cada grama do material) ao biofilme de *C. albicans*. Amostras (n=7; 75 x 10 x 6 mm) foram confeccionadas e armazenadas em água destilada a 37°C por 24 h, sete e 14 dias. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa nos valores de resistência ao descolamento entre os grupos Ni-S, Ce-S, Cl-S e Ni-T, Mc-T, Ce-T em relação aos controles. Foi notado um aumento nos valores de resistência ao descolamento com o tempo de imersão para ambos os materiais. A maioria das falhas foi coesiva dos materiais macios, entretanto, falhas mistas e adesivas também foram observadas após sete e 14 dias para todos os grupos experimentais. Os autores concluíram que a adição dos fármacos, exceto o itraconazol, nos materiais macios não resultou em valores inferiores aos sugeridos para resistência da união ao descolamento (0,045 MPa) após sete e 14 dias de avaliação.

O efeito da adição de CMI ao biofilme de *Candida albicans* de fármacos antifúngicos na sorção de água e solubilidade dos materiais macios temporários Softone e Trusoft foi avaliado por Lima em 2013.⁸⁷ Corpos de prova (n=10; 50 x 0,5 mm) de ambos os materiais foram confeccionados sem (controle) ou com a incorporação dos fármacos nistatina (0,032 g), cetoconazol (0,128 g) ou diacetato de clorexidina (0,064 g para cada grama do material). Para determinar a sorção de água e solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$), os espécimes foram dessecados em dessecador a vácuo a 37°C, imersos em 20 mL de água destilada a 37°C por 24 h, sete ou 14 dias, pesadas, dessecadas e pesadas novamente. A sorção de água dos dois materiais avaliados aumentou com a adição de nistatina e clorexidina após 24 h e sete dias de imersão em água. Após 14 dias, exceto pela clorexidina no Softone ($483,0 \pm 61,0 \mu\text{g}/\text{mm}^3$), a sorção dos materiais não foi afetada pela adição dos fármacos (Softone: Ni- $310,7 \pm 55,0$; Ce- $202,1 \pm 52,3$ / Trusoft: Ni- $320,3 \pm 22,9$; Ce: $300,5 \pm 69,5$; Clx: $331,0 \pm 48,2 \mu\text{g}/\text{mm}^3$) em comparação aos respectivos controles (Softone: $244,0 \pm 42,0$; Trusoft: $274,9 \pm 83,1 \mu\text{g}/\text{mm}^3$). Para todos os grupos, o

tempo de imersão aumentou a solubilidade do Softone (24 h: $18,8 \pm 9,8$; sete dias: $32,2 \pm 4,5$; 14 dias: $58,8 \pm 8,8 \mu\text{g}/\text{mm}^3$), mas não do Trusoft (24 h: $12,5 \pm 4,5$; sete dias: $14,3 \pm 5,2$; 14 dias: $15,5 \pm 5,7 \mu\text{g}/\text{mm}^3$). Em relação aos controles e para todos os períodos, a solubilidade dos dois materiais foi alterada com clorexidina e cetoconazol, mas não sofreu influência da nistatina. Foi possível concluir após 14 dias de imersão em água, a adição das CMI de nistatina e cetoconazol nos dois materiais e de clorexidina no Trusoft não interferiu com a sorção de água. A solubilidade dos dois materiais temporários testados não foi alterada pela nistatina em até 14 dias de avaliação.

O objetivo do estudo de Urban et al. (2014)⁶² foi avaliar o efeito da adição de fármacos antifúngicos para tratamento de estomatite protética na rugosidade de superfície e dureza Shore A de materiais macios temporários para base de prótese (Softone e Trusoft). Corpos de prova ($n=8$; $36 \times 7 \times 6 \text{ mm}$) dos dois materiais foram confeccionados sem (controle) ou com a incorporação dos fármacos nas seguintes concentrações: nistatina (500.000 e 1.000.000 UI), miconazol (125 e 250 mg), cetoconazol (100 e 200 mg), itraconazol (100 e 200 mg) e diacetato de clorexidina (5% e 10%). Ambas as propriedades foram avaliadas após a imersão dos corpos de prova em água destilada a 37°C durante 24 h, sete e 14 dias. Os resultados demonstraram um aumento na dureza dos materiais modificados pelos fármacos ao longo do tempo, exceto para o itraconazol. A rugosidade dos materiais não foi alterada pela adição dos fármacos testados, com exceção do miconazol e do diacetato de clorexidina no Softone, que resultaram em aumento dessa propriedade. Em comparação aos controles, apenas o diacetato de clorexidina e o itraconazol promoveram diferença de rugosidade para ambos os materiais. Os autores concluíram que as menores alterações de dureza e de rugosidade ao longo dos 14 dias de avaliação foram observadas com a adição de itraconazol nos dois materiais macios temporários avaliados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

A proposta deste estudo foi avaliar a morfologia e a rugosidade de superfície e a liberação in vitro de materiais macios temporários modificados pela incorporação de fármacos antifúngicos, utilizados para o tratamento da estomatite protética, em suas concentrações mínimas inibitórias (CMI) ao biofilme de *C. albicans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As propostas deste estudo foram:

1. Avaliar a morfologia e a rugosidade de superfície de materiais macios temporários para base de prótese removível modificados pela incorporação de fármacos antifúngicos, por meio das análises em MEV e microscopia confocal laser, em função de:

- *dois materiais macios temporários: um condicionador de tecido (Softone) e um reembasador resiliente (Trusoft);*
- *cinco fármacos antifúngicos utilizados no tratamento da estomatite protética (nistatina, miconazol, cetoconazol, diacetato de clorexidina e itraconazol), adicionados aos materiais macios em suas concentrações mínimas inibitórias ao biofilme de C. albicans;*
- *três períodos de armazenamento em água destilada: 24 h, 7 e 14 dias, abrangendo o período utilizado para tratamento da estomatite protética.*

2. Avaliar, diariamente, a liberação in vitro de fármacos antifúngicos a partir de materiais macios temporários para base de prótese removível utilizando espectrofotometria UV-Vis, em função de:

- *dois materiais macios temporários: um condicionador de tecido (Softone) e um reembasador resiliente (Trusoft);*
- *dois fármacos antifúngicos utilizados no tratamento da estomatite protética (nistatina e diacetato de clorexidina), adicionados aos materiais macios em suas concentrações mínimas inibitórias ao biofilme de C. albicans;*
- *armazenamento em água destilada por até 14 dias, abrangendo o período utilizado para tratamento da estomatite protética.*

3. Complementar as informações obtidas no estudo de liberação por meio da caracterização do sistema fármaco-matriz utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC), visando avaliar a interação existente entre as partículas dos antifúngicos nistatina e diacetato de clorexidina e os materiais Softone e Trusoft.

3.3 HIPÓTESES TESTADAS

As hipóteses testadas neste estudo foram que:

1. a incorporação dos cinco fármacos antifúngicos aos materiais macios temporários resultará em alterações na sua morfologia de superfície;
2. os fármacos Ni e Clx serão liberados dos materiais macios para o meio aquoso em concentrações variadas durante o período de 14 dias de análise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- ácido acético glacial P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- ácido clorídrico P.A. 37% (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- água purificada pelo processo de destilação (H₂O destilada) em equipamento modelo MB 1004, Marte® tipo Pilsen, São Paulo, SP, Brasil
- álcool isopropílico P.A. (Neon, São Paulo, SP, Brasil)
- amido solúvel 1% (Merck, São Paulo, SP, Brasil)
- aspirador de borracha para pipeta de 3 válvulas (Kartell, Milão, Lombardia, Itália)
- balança analítica de precisão (modelo AW 220, Shimadzu, São Paulo, SP, Brasil)
- balão volumétrico de 10 mL de fundo chato (Uniglas, Alvorada, RS, Brasil)
- balão volumétrico de 100 mL de fundo chato (Uniglas, Alvorada, RS, Brasil)
- balão volumétrico de 1000 mL de fundo chato (Uniglas, Alvorada, RS, Brasil)
- balão volumétrico de 50 mL de fundo chato (Uniglas, Alvorada, RS, Brasil)
- bureta graduada de 50 mL (Uniglas, Alvorada, RS, Brasil)
- buril esculpido de Le Cron n° 5 (SS White/Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- cadinho de alumínio padrão com tampa 20 µL (TA Instruments®, New Castle, DE, EUA)
- cetoconazol (Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil)
- condicionador de tecido Softone™ (Bosworth Company, Skokie, IL, EUA)
- cloreto de cetil trimetil amônio (Dehyquart® A, Via Farma, São Paulo, SP, Brasil)
- destilador de água (modelo MB 1004, Marte® tipo Pilsen, São Paulo, SP, Brasil)
- diacetato de clorexidina 98% (Acros Organics, Morris Plains, NJ, EUA)

- equipamento DSC (TA Instruments® Q200, New Castle, DE, EUA)
- erlenmeyer graduado de 500 mL (Uniglas, Alvorada, RS, Brasil)
- espátula em aço inoxidável nº 36 (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil)
- espectrofotômetro UV-Vis (Thermo scientific, Genesys 10 UV scanning, Madison, WI, EUA)
- estufa microprocessada bacteriológica (Modelo NI 1524, Nova Instruments, Piracicaba, SP, Brasil)
- filtro para seringa CHROMAFIL® Xtra 0,45 µm (Macherey-Nagel, Düren, Colônia Alemanha)
- frasco âmbar de vidro de 100 mL com tampa e batoque (Apacê, São Paulo, SP, Brasil)
- frasco âmbar de vidro de 50 mL com tampa e batoque (Apacê, São Paulo, SP, Brasil)
- hidróxido de sódio P.A. (Henrifarma, São Paulo, SP, Brasil)
- hipoclorito de sódio 2,0 a 2,5% ("Qboa", Osasco, SP, Brasil)
- iodeto de potássio P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- itraconazol péletes (Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil)
- lauril sulfato de sódio pó (Viafarma, Ipiranga, SP, Brasil)
- matriz metálica em aço inoxidável vazada com dimensões internas de 30 x 5 x 4 mm
- matriz metálica em aço inoxidável vazada com dimensões internas de 50 mm de diâmetro x 2 mm de espessura
- metalizador (modelo IC-50 Ion Coater, Shimadzu, Quioto, Japão)
- metanol P.A. ACS (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- miconazol (Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil)

- micropipeta mecânica monocal de volume regulável 100-1000 μ L (Labmate, HTL, Varsóvia, Polônia)
- microscópio confocal laser para análise de superfície (Lext OLS4000, Olympus, Tóquio, Japão)
- microscópio eletrônico de varredura (modelo SSX 550 Superscan, Shimadzu, Quioto, Japão)
- nistatina (Pharmanostra, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- *N-N*-dimetilformamida P.A. (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- *p*-aminoacetofenona (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- papel alumínio (Rochedo, São Bernardo do Campo, SP, Brasil)
- papel indicador de pH 1 - 14 indicador universal (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)
- pinça de madeira para tubos de ensaio de 18 cm (Ical, São Paulo, SP, Brasil)
- pipeta de vidro graduada de 20 mL (Uniglas, Alvorada, RS, Brasil)
- placa de vidro de 10 mm (Golgram, São Paulo, SP, Brasil)
- ponteira para micropipeta Universal Fit Pipette Tips de 100-1000 μ L (Corning Costar Corporation, Nova Iorque, NY, EUA)
- pote de vidro Paladon com tampa (Art Vidro Brunor, Curitiba, PR, Brasil)
- pote plástico de 150 mL com tampa
- proveta de vidro graduada de 100 mL (Uniglas, Alvorada, RS, Brasil)
- reembasador resiliente Trusoft™ (Bosworth Company, Skokie, IL, EUA)
- suporte metálico (stub) de 12,5 mm de diâmetro, pin de 8 mm de comprimento (Zeiss, São Paulo, SP, Brasil)
- suporte universal (Prolab, São Paulo, SP, Brasil)
- vaselina sólida (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil)

- tiosulfato de sódio 0,1 N (Synth, Diadema, SP, Brasil)

4.2 MATERIAIS

Os materiais macios temporários selecionados para este estudo estão caracterizados na Tabela 1.

Tabela 1. Materiais macios temporários selecionados

Material	Tipo/Tempo de utilização recomendado	Lote		Composição		Proporção pó/líquido	Tempo de mistura	Tempo de plastificação
		Pó	Líquido	Pó	Líquido			
Softone™ 	Condicionador de tecido (3 a 7 dias)	1002- 035	1108- 346	PEMA, peróxido de benzoíla, dióxido de titânio	Ftalato de alquilo, álcool etílico	1 g/1 mL	1 min	5 a 7 min à temperatura ambiente
Trusoft™ 	Reembasador resiliente (30 a 60 dias)	1208- 364	1211- 495	PEMA, peróxido de benzoíla, dióxido de titânio	Ftalato de alquilo, álcool etílico	1 g/1 mL	1 min	5 a 7 min à temperatura ambiente

Fonte: Bosworth Company, Skokie, IL, EUA; MSDS dos materiais fornecidos pelo fabricante.

Nota: PEMA (polietil metacrilato)

Os fármacos antifúngicos selecionados para este estudo e as concentrações mínimas inibitórias ao biofilme de *C. albicans* determinadas em estudo prévio^{47,48} estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Fármacos antifúngicos selecionados e suas CMI ao biofilme de *C. albicans* utilizadas

Fármaco/Sigla	Lote	CMI para 1 g do material macio
Nistatina (Ni)	12030665B	0,032 g
Miconazol (Mc)	1207033303	0,256 g
Cetoconazol (Ce)	1211004307	0,128 g
Clorexidina (Clx)	206986-79-0	0,064 g
Itraconazol (It)	1209003409	0,256 g

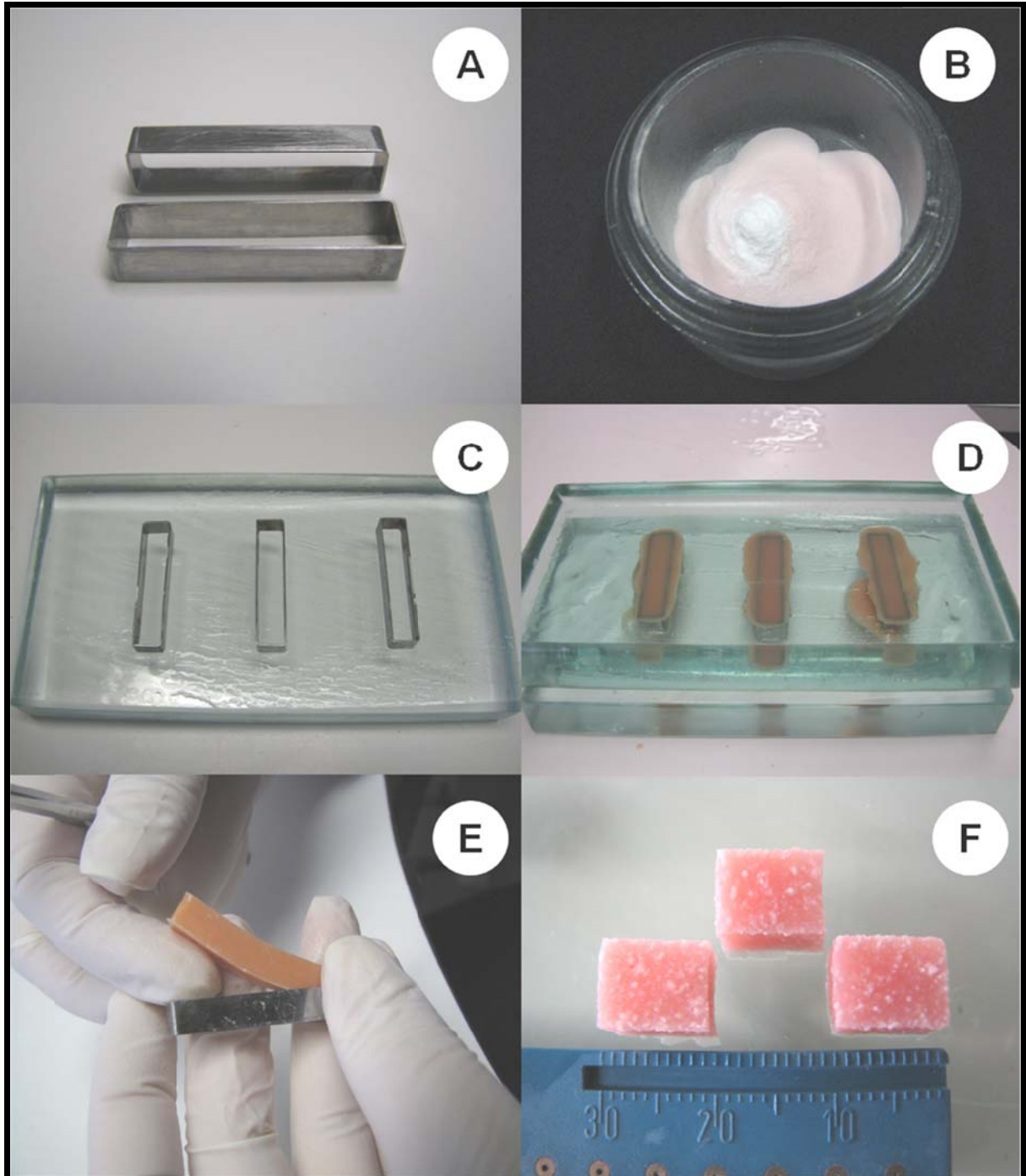
Fonte: BUENO, M. G. **Avaliação microbiológica, física e mecânica de materiais resilientes modificados pela adição de antimicrobianos para tratamento de estomatite protética.** 2011, 211 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.⁴⁷

4.3 ANÁLISES DE SUPERFÍCIE

4.3.1 Confecção dos corpos de prova

Os corpos de prova (n = 2) dos materiais macios temporários modificados ou não pela adição de antifúngicos (grupo controle) foram confeccionados nas dimensões de 30 mm de comprimento x 5 mm de largura x 4 mm de espessura utilizando matrizes em aço inoxidável vazadas (Figura 1A).

FIGURA 1 - Confeção dos corpos de prova para as análises de superfície. **A** – Matriz metálica; **B** – Adição do pó dos fármacos ao pó do material macio; **C** – Posicionamento das matrizes; **D** – Inserção do material modificado no interior das matrizes entre duas placas de vidro; **E** – Remoção do corpo de prova do interior da matriz; **F** – Corpos de prova finalizados



Fonte: A autora

As quantidades em pó dos antifúngicos (Tabela 2; Figura 1B) foram espatuladas manualmente ao pó de cada material macio até a obtenção de uma

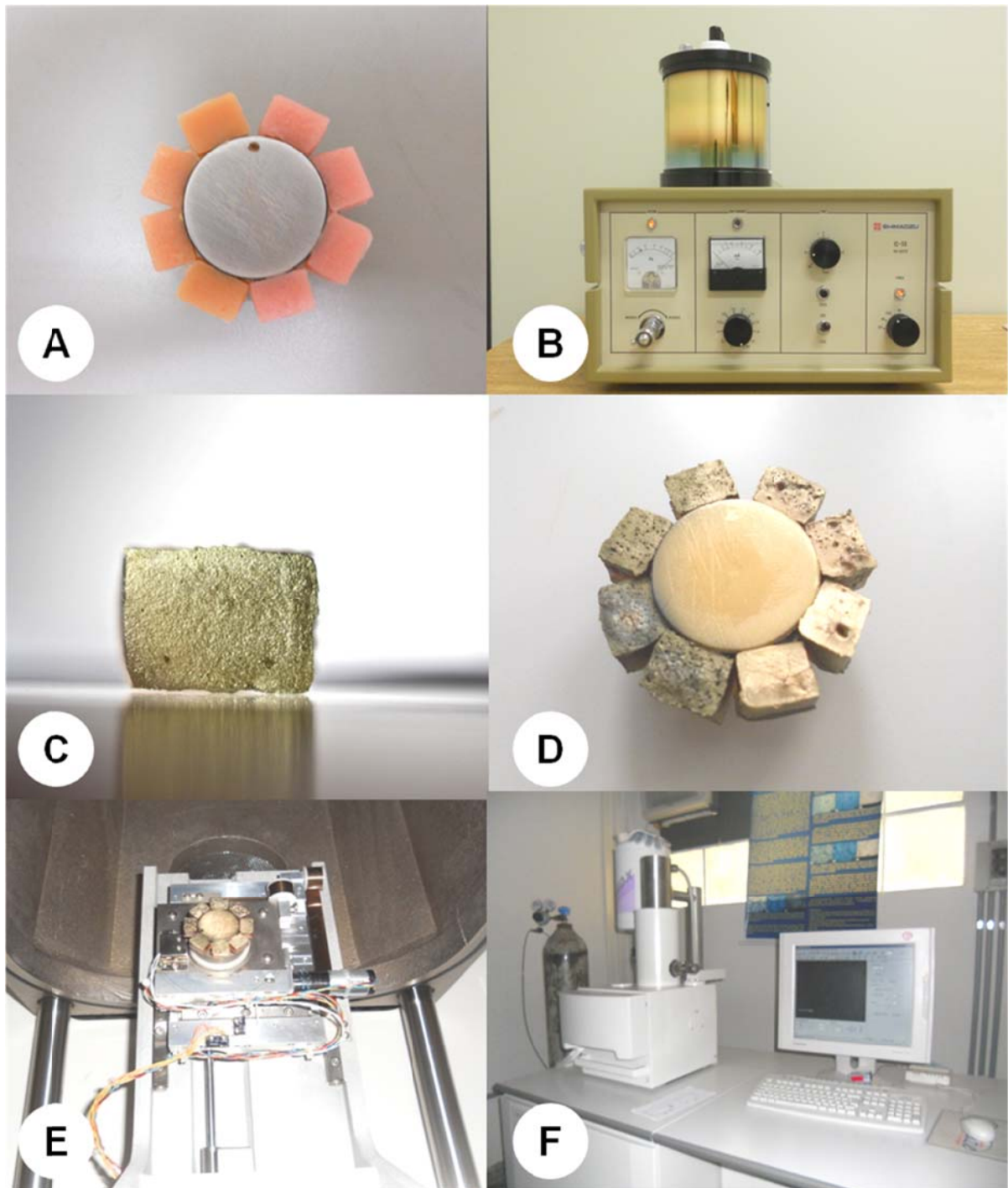
mistura homogênea.^{18,28} Os líquidos dos materiais foram, então, adicionados e a mistura foi espatulada de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 1). O material modificado foi inserido em uma matriz vazada sobre uma placa de vidro vaselinada e coberto com outra placa, sendo mantido em posição durante o tempo de plastificação recomendado pelo fabricante (Tabela 1; Figuras 1C e 1D). Após esse período, os corpos de prova foram retirados da matriz vazada (Figura 1E) e os excessos, removidos utilizando um esculpador de Le Cron. Cada corpo de prova foi seccionado em três amostras de dimensões 10 x 5 x 4 mm (Figura 1F). Após a secção, foram armazenadas em água destilada a 37°C durante os períodos de 24 h, sete ou 14 dias. Em seguida, foram armazenadas a seco em estufa a 37°C por mais um período de 48 h.

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

Inicialmente, uma pequena quantidade aleatória do pó de cada fármaco antifúngico foi fixada em *stubs* metálicos e metalizada com uma fina camada de ouro em ambiente com vácuo. Cada uma das amostras dos pós dos cinco fármacos foi observada em MEV a uma voltagem de aceleração de 20 KV e varredura de 100 s.²⁸

As amostras dos corpos de prova, em cada um dos períodos de avaliação, também foram fixadas em *stubs* metálicos (Figura 2A) e submetidas ao processo de cobertura com uma fina camada de ouro utilizando um metalizador (Figuras 2B, 2C e 2D) em ambiente com vácuo. Após cobertura, os corpos de prova foram posicionados no porta *stubs* da câmara de vácuo (Figura 2E) do microscópio eletrônico de varredura (Figura 2F). Toda a superfície das amostras foi observada em MEV a uma voltagem de aceleração de 20 KV em áreas de 25 μm^2 com varredura de 100 s.²⁸ As imagens mais representativas de cada amostra foram selecionadas para ilustrar as características de cada grupo.

FIGURA 2 – Processo de metalização e análise das amostras em MEV. **A** – Fixação das amostras em *stub* metálico; **B** – Metalizador; **C** e **D** - Amostras após metalização; **E** – Amostras posicionadas no porta *stub* da câmara de vácuo; **F** – MEV



Fonte: A autora

4.3.3 Microscopia confocal laser para análise de superfície

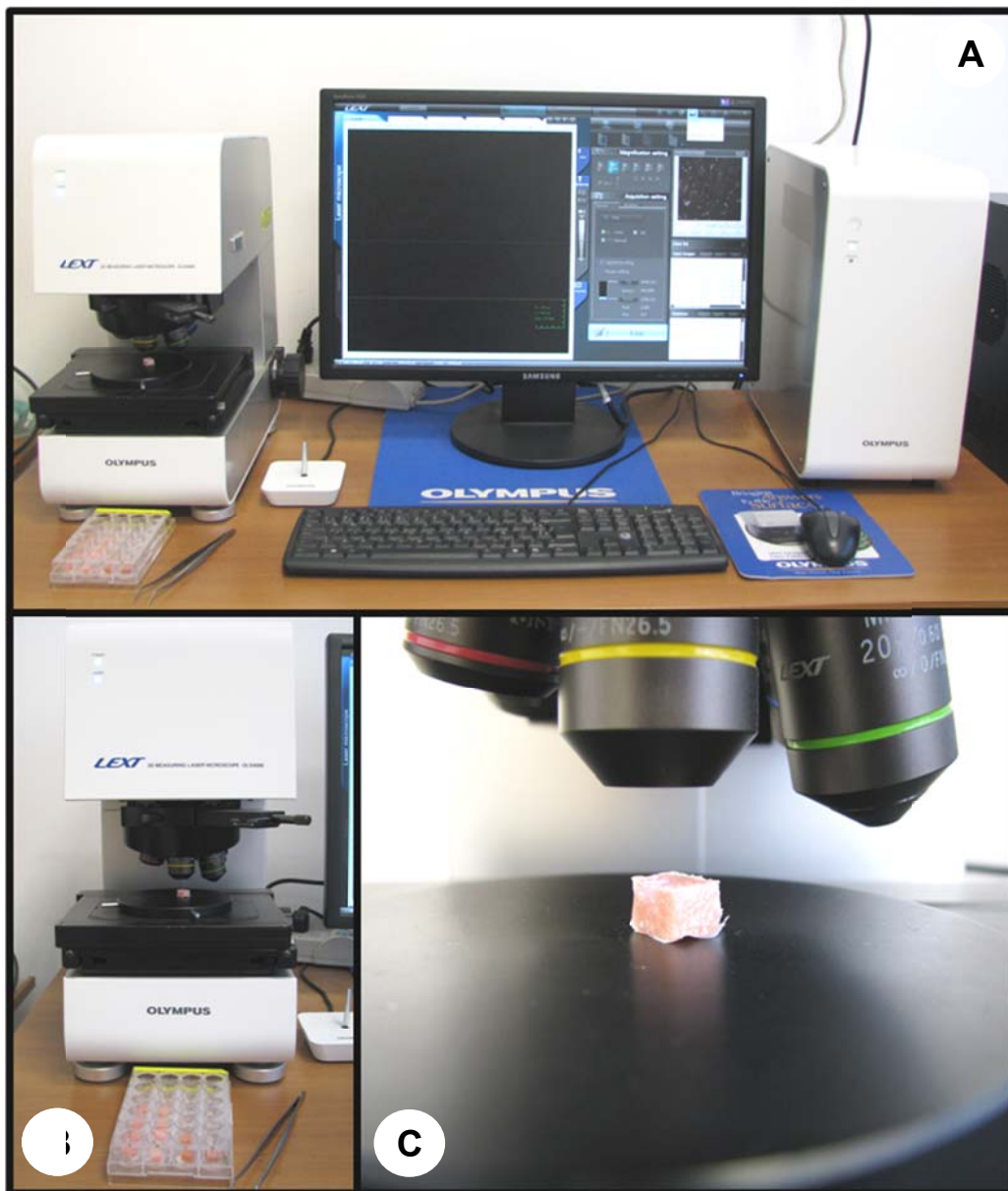
As análises em microscopia confocal laser foram gentilmente realizadas pela empresa Arotec (Cotia, SP) com o auxílio do técnico Alex F. Coleti.

Corpos de prova adicionais ($n = 2$) foram confeccionados da mesma forma como descrito para as análises em MEV, armazenados nos mesmos períodos de imersão em água destilada em estufa a 37°C e, então, submetidos à microscopia confocal laser para análise de superfície (Figura 3A).

A superfície total da amostra foi observada, inicialmente, a uma magnificação de cinco vezes com o intuito de selecionar a área mais representativa do corpo de prova. Em seguida, uma área total de 1280 μm^2 de cada corpo de prova foi observada a uma magnificação de dez vezes (Figura 3B e 3C), utilizando laser na cor verde na faixa espectral de 405 nm. A rugosidade superficial foi avaliada ao longo de três linhas assinaladas aleatoriamente (cut off lambda C 80 μm), registrando os dados de acordo com o parâmetro de Ra (rugosidade média). Foram removidos pequenos picos e ruídos através de um filtro gaussiano e os dados foram processados utilizando o software (OLS 4000-BSW, Olympus, Tóquio, Japão).

Após a obtenção dos dados, análises descritivas foram realizadas para a apresentação dos resultados dos testes de avaliação de superfície.

FIGURA 3 – Análise das amostras em microscopia confocal laser. **A** – Microscópio confocal laser; **B** e **C** – Posicionamento e análise das amostras



Fonte: A autora

4.4 LIBERAÇÃO IN VITRO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

4.4.1 Preparo das soluções padrão e validação da metodologia para Clx

Para o preparo da concentração da solução estoque (1.000 $\mu\text{g/mL}$), foram solubilizados 50 mg de Clx em 50 mL de metanol em balão volumétrico.

A partir daí, foram preparadas oito soluções analíticas para a confecção da curva de calibração de Clx. Os volumes pipetados da solução estoque de Clx e a concentração final de cada uma das soluções analíticas podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Soluções analíticas para preparo da curva de calibração de Clx

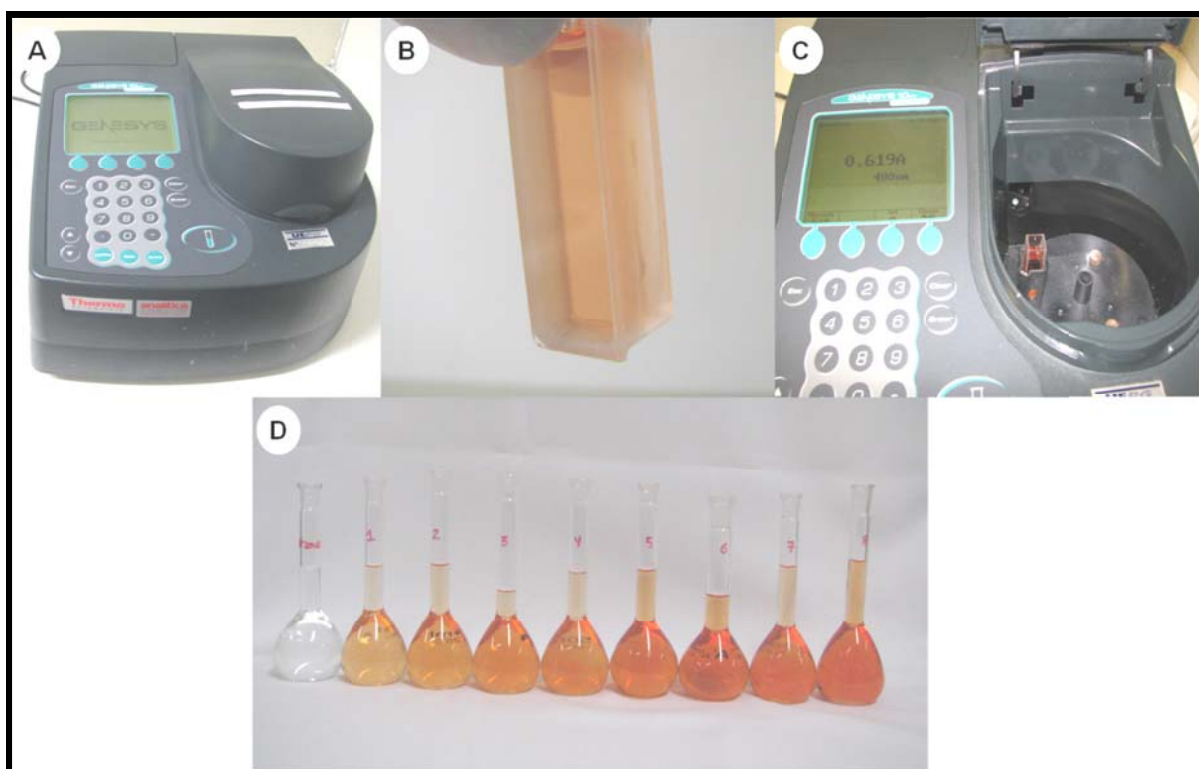
Solução analítica	Volume pipetado (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	0	0
2	50	1
3	100	2
4	250	5
5	500	10
6	750	15
7	1000	20
8	1250	25

Fonte: A autora

Após pipetar cada um dos volumes apresentados na Tabela 3, foram adicionados 40 mL de água destilada, 2,5 mL do tensoativo cloreto de cetil trimetil amônio, 0,25 mL de hidróxido de sódio 1 N (excesso de alcalinidade conferido com papel indicador de pH), 0,9 mL de álcool isopropílico e 1 mL da solução de hipoclorito de sódio alcalino em balões volumétricos de 50 mL. Essa mistura de reagentes produziu um precipitado de Clx, causando a mudança de cor da solução. O volume final do balão foi completado com a adição de água destilada. Cada um dos balões foi agitado levemente e após 25 min, a absorvância de cada uma das concentrações de Clx foi determinada por colorimetria utilizando um espectrofotômetro UV-Vis a 480 nm (Figura 4A). Anteriormente às análises, as soluções eram filtradas em um filtro de 0,45 μm de tamanho de poro. Em seguida, foi feita a calibração do equipamento com a solução analítica 1 (branco). A seguir, foram feitas as mensurações das soluções analíticas, sequencialmente, de 2 a 8 por meio da utilização de uma cubeta de quartzo (Figuras 4B a 4D). As leituras foram feitas em sextuplicata em ordem crescente de concentração. Anteriormente a cada

leitura, a cubeta de quartzo era lavada três vezes com a mesma solução a ser analisada com o fim de condicionar a cubeta.

FIGURA 4 – Quantificação das soluções analíticas de Clx para a elaboração da curva de calibração. **A** - Espectrofotômetro UV-Vis; **B** – Solução colocada na cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico; **C** – Cubeta colocada no espectrofotômetro para análise a 480 nm; **D** – Diferentes concentrações das soluções analíticas de Clx para a curva de calibração



Fonte: A autora

Como pode ser observado na Figura 4D, a mistura entre os reagentes adicionados à solução produziu uma coloração alaranjada, cuja saturação da cor foi proporcional à concentração de Clx presente na amostra. A resposta do equipamento em miliabsorvância (mAbs) foi, consequentemente, proporcional à concentração de Clx das soluções. Dessa forma, com os valores em sextuplicata das concentrações e absorvâncias, foi obtida uma equação de regressão linear que relaciona a saturação da cor da Clx à sua concentração na amostra. Três curvas de calibração foram construídas em três dias não consecutivos; uma curva de calibração média foi produzida e a linearidade do método, obtida.

A utilização desta metodologia analítica foi em concordância com o método proposto por Holbrook (1958).⁸⁸

4.4.2 Preparo das soluções padrão e validação da metodologia para Ni

Para o preparo da concentração da solução estoque (1.000 µg/mL), foram solubilizados 100 mg de Ni em 10 mL de dimetilformamida até sua total diluição. Em seguida, o volume final do balão volumétrico de 100 mL foi completado com metanol.

A partir daí, foram preparadas oito soluções analíticas para a confecção da curva de calibração de Ni. Os volumes pipetados da solução estoque de Ni e a concentração final de cada uma das soluções analíticas podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Soluções analíticas para preparo da curva de calibração de Ni

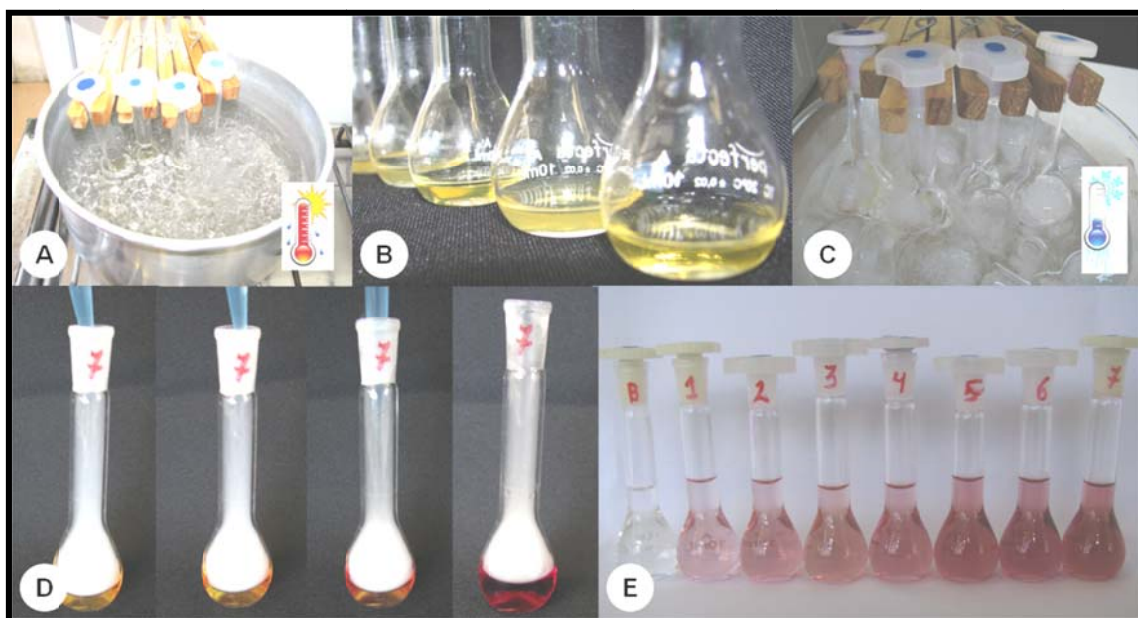
Solução analítica	Volume pipetado (µL)	Concentração (µg/mL)
1	0	0
2	10	1
3	30	3
4	50	5
5	70	7
6	100	10
7	150	15
8	200	20

Fonte: A autora

Após pipetar cada um dos volumes apresentados na Tabela 4, foi adicionado 1 mL de hidróxido de sódio 1 M em balões volumétricos de 10 mL. Estes balões foram, então, aquecidos em água em ebulição durante 2 min sob agitação constante (Figura 5A). A coloração da solução foi alterada neste momento de transparente para amarelada (Figura 5B). Em seguida, foram mantidos em água gelada por 2 min

com o intuito de deter a reação química (Figura 5C). Foram adicionados 1,5 mL da solução de p-aminoacetofenona e 1 mL de ácido clorídrico P.A. 37%. O volume final do balão (10 mL) foi completado com a adição de metanol. Cada um dos balões foi agitado levemente e a absorvância de cada uma das concentrações de Ni foi imediatamente determinada por colorimetria utilizando o espectrofotômetro UV-Vis a 520 nm. Anteriormente às análises, as soluções eram filtradas (0,45 μ m tamanho de poro). Em seguida, foi feita a calibração do equipamento com a solução analítica 1 (branco). A seguir, foram feitas as mensurações das soluções analíticas, sequencialmente, de 2 a 8 por meio da utilização da cubeta de quartzo. As leituras foram feitas em sextuplicata em ordem crescente de concentração. Anteriormente a cada leitura, a cubeta de quartzo era lavada três vezes com a mesma solução a ser analisada com o fim de condicionar a cubeta.

FIGURA 5 – Preparo das soluções analíticas de Ni para a elaboração da curva de calibração. **A** – Balões em aquecimento em banho maria em ebulição sob agitação constante; **B** – Mudança da cor de transparente para amarela após o aquecimento; **C** – Resfriamento dos balões em água gelada; **D** – Mudança gradual da cor para rosa após a adição de ácido clorídrico; **E** - Diferentes concentrações das soluções analíticas de Ni para a curva de calibração



Fonte: A autora

Como pode ser observado nas Figuras 5D e 5E, a mistura entre os reagentes adicionados à solução produziu uma coloração rósea, cuja saturação da

cor também foi proporcional à concentração de Ni presente na amostra. Foi obtida uma equação de regressão linear que relaciona a saturação da cor da Ni à sua concentração na amostra. Três curvas de calibração também foram construídas em três dias não consecutivos; uma curva de calibração média foi produzida e a linearidade do método, obtida.

A utilização desta metodologia analítica foi em concordância com o método proposto por Amer e Habeeb.⁸⁹

4.4.3 Confeção dos corpos de prova

Corpos de prova (n = 6) dos materiais macios temporários modificados ou não (controles) pela adição dos fármacos Clx ou Ni foram confeccionados nas dimensões de 50 mm de diâmetro x 2 mm de espessura⁹⁰ utilizando matrizes metálicas vazadas confeccionadas em aço inoxidável (Figura 6).

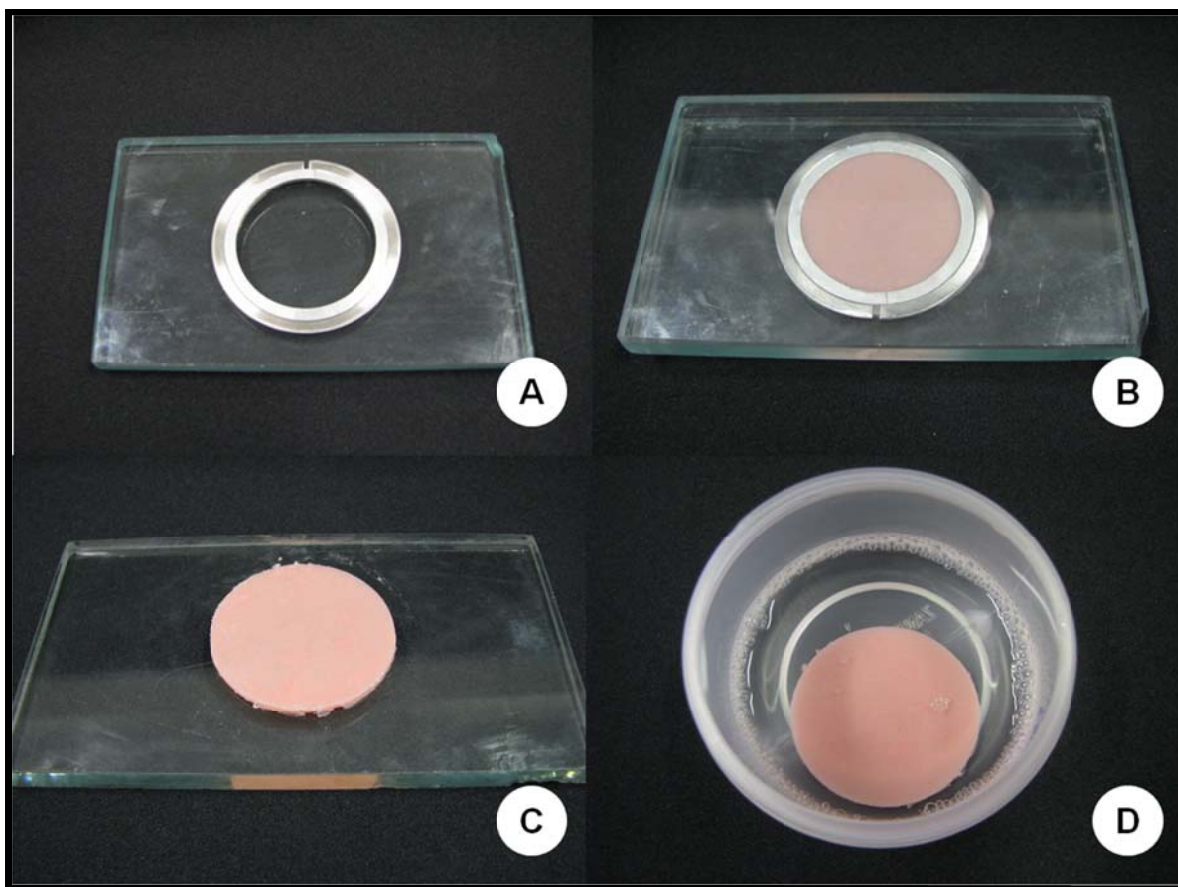
FIGURA 6 – Matrizes metálicas para confecção dos corpos de prova das análises de liberação



Fonte: A autora

Os fármacos em pó foram incorporados nas suas CMLs (Tabela 2) ao pó dos materiais macios, os quais foram espatulados de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 1) assim como descrito no item 4.3.1. Os materiais foram inseridos na matriz vazada, cobertos com uma placa de vidro (Figuras 7A e 7B) e mantidos sob carga de 1 Kg à temperatura ambiente durante os tempos de plastificação recomendados pelo fabricante (Tabela 1). Após esse período, os corpos de prova foram retirados da matriz vazada (Figura 7C) e os excessos dos materiais foram removidos utilizando um esculpidor de Le Cron. A seguir, os corpos de prova foram examinados visualmente e somente aqueles que demonstraram mínima porosidade foram utilizados.⁹¹

FIGURA 7 – Confeção dos corpos de prova para as análise de liberação. **A** – Matriz metálica posicionada sobre a placa de vidro; **B** – Inserção do material modificado no interior da matriz entre duas placas de vidro; **C** – Corpo de prova removido da matriz; **D** – Armazenamento do corpo de prova em água destilada



Fonte: A autora

Na sequência, os corpos de prova foram armazenados individualmente em potes plásticos com tampa contendo 50 mL de água destilada a 37°C (Figura 7D) durante um período de 14 dias.

Para o diacetato de clorexidina, é importante ressaltar que o volume de água destilada utilizado para imersão dos corpos de prova foi suficiente para manter as condições *sink* do meio. Tendo em consideração que a solubilidade em água do diacetato de clorexidina é de 0,015 g/mL, o volume necessário do meio para que a saturação fosse suficiente para manter as condições *sink* seria de, pelo menos, 38,4 mL de água destilada.⁹²

Para a nistatina, o mesmo volume foi utilizado para a imersão dos corpos de prova. Uma vez que este fármaco é praticamente insolúvel em água, foi necessária

a adição de 2% (1 g) do surfactante lauril sulfato de sódio. Neste caso, a presença deste tensoativo causa menor impacto na solubilização do fármaco.

4.4.4 Quantificação dos fármacos liberados a partir dos materiais macios

Diariamente, alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções de armazenamento dos corpos de prova foram coletadas para análise da liberação dos fármacos a partir dos materiais macios.

A esta alíquota, foram adicionados os mesmos reagentes e seguidos os mesmos protocolos descritos para o preparo e a análise das soluções analíticas das curvas de calibração de Clx e Ni em UV-Vis. A quantificação da concentração dos fármacos liberados dos materiais foi possível pela utilização das equações de regressão linear obtidas a partir das curvas de calibração.

Após cada pipetagem diária da solução dos corpos de prova, o mesmo volume de alíquota removido para análise (1 mL) era repostado com igual volume de água destilada. No caso da nistatina, para repor a alíquota removida, era preparada uma solução de 50 mL de água destilada com 2% de lauril sulfato de sódio, 1 mL desta solução era retirado e adicionado ao volume do meio. Assim, a concentração do surfactante sempre era mantida na solução.

Em seguida, a porcentagem de liberação diária foi calculada em relação à quantidade inicial de fármaco adicionada nos corpos de prova e o perfil de liberação foi obtido em relação ao tempo total de 14 dias.

A avaliação matemática da cinética de liberação foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 1), ao modelo biexponencial (Equação 2), ao modelo ordem zero (Equação 3) e ao modelo Weibull (Equação 4), considerando os resultados do critério de seleção do modelo (MSC), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade de cada modelo, utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

$$\%D = 100 \cdot (1 - e^{-kt})$$

(1)

$$\%D = 100 \cdot [1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$$

(2)

$$D = k \cdot t$$

(3)

$$D = 100 \cdot \{1 - e^{-[(t/t_d)^b]}\}$$

(4)

nas quais: “%**D**” é o percentual do fármaco dissolvido no tempo “**t**”, “**k**”, “**α**” e “**β**” são constantes cinéticas de dissolução verificadas; “**A**” e “**B**” são concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; “**t_d**” é o tempo no qual 62,3% do fármaco são dissolvidos; “**b**” é o parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

A partir dos dados de liberação obtidos, também foi realizada a análise dos mecanismos envolvidos no processo de liberação dos fármacos a partir de cada matriz polimérica empregando-se o *software* Scientist® 3.0 for Windows (Micromath®, Saint Louis, MO, EUA). Foi utilizado o modelo semiempírico de Korsmeyer-Peppas⁹³, com a finalidade de ampliar a informação sobre o mecanismo de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica. Este método baseia-se na lei de potências que relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo e deve ser aplicado para os primeiros 60% de fármaco liberado:

$$ft = a \cdot t^n$$

(5)

na qual: “**a**” é a constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; “**n**” é o expoente de liberação que é

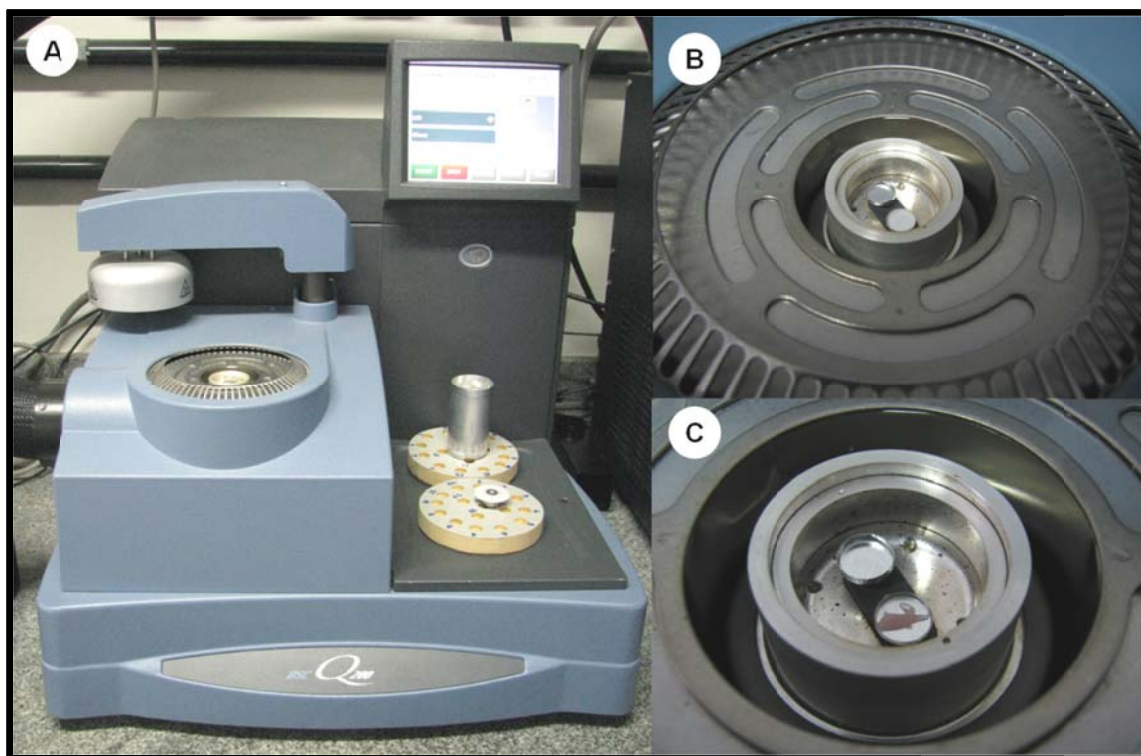
indicativo do mecanismo de liberação; “***ft***” é a fração do fármaco dissolvida no tempo “***t***”.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA FÁRMACO-MATRIZ POR DSC

Corpos de prova (n = 2) contendo ou não (controle) os fármacos Clx e Ni de ambos os materiais macios foram confeccionados nas dimensões de 10 mm de diâmetro x 1 mm de espessura.

Amostras de aproximadamente 5 mg retiradas de cada um dos corpos de prova, logo após sua confecção, foram colocadas em cadinhos de alumínio, os quais foram transferidos para o aparelho de DSC. Cadinhos inertes, utilizados como referência também foram transferidos para o porta amostras do equipamento (Figura 8).

FIGURA 8 – Análise térmica em calorimetria exploratória diferencial. **A** – Equipamento DSC; **B** – Cadinhos de alumínio dentro do forno; **C** – Forno do equipamento contendo os cadinhos referência e com a amostra



Fonte: A autora

O aparelho de DSC foi calibrado em um ambiente de nitrogênio, a um fluxo de 50 mL/min, e as amostras foram aquecidas de 0° a 300°C, em uma taxa de aquecimento de 20°C/min.

O fluxo de calor através dos cadinhos foi plotado em função da temperatura das amostras gerando curvas que ilustraram em °C os pontos de fusão dos fármacos e a temperatura de transição vítrea (T_g) das matrizes poliméricas, utilizando o *software* TA Instruments Universal Analysis 2000 (New Castle, DE, EUA).

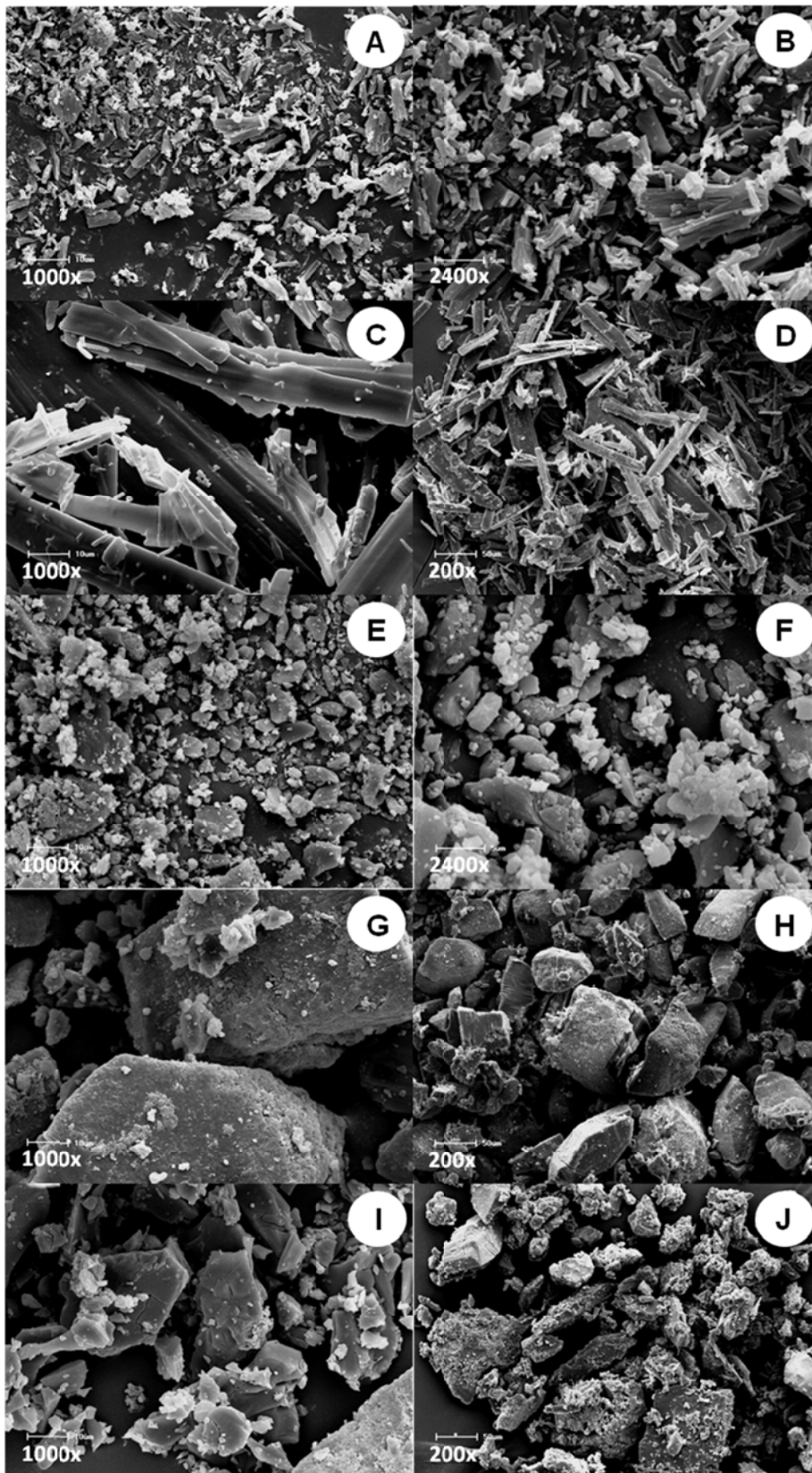
Análises calorimétricas dos pós dos fármacos Clx e Ni foram realizadas nas mesmas condições das amostras dos corpos de prova para possibilitar comparações entre os dados obtidos.

5 RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Inicialmente, com o intuito de caracterizar morfologicamente apenas as partículas dos antifúngicos selecionados para este estudo, foram obtidas algumas imagens em MEV (Figura 9).

FIGURA 9 – Imagens em MEV das partículas dos fármacos avaliados neste estudo. **A e B** – Ni; **C e D** – Mc; **E e F** – Ce; **G e H** – Clx e **I e J** – It



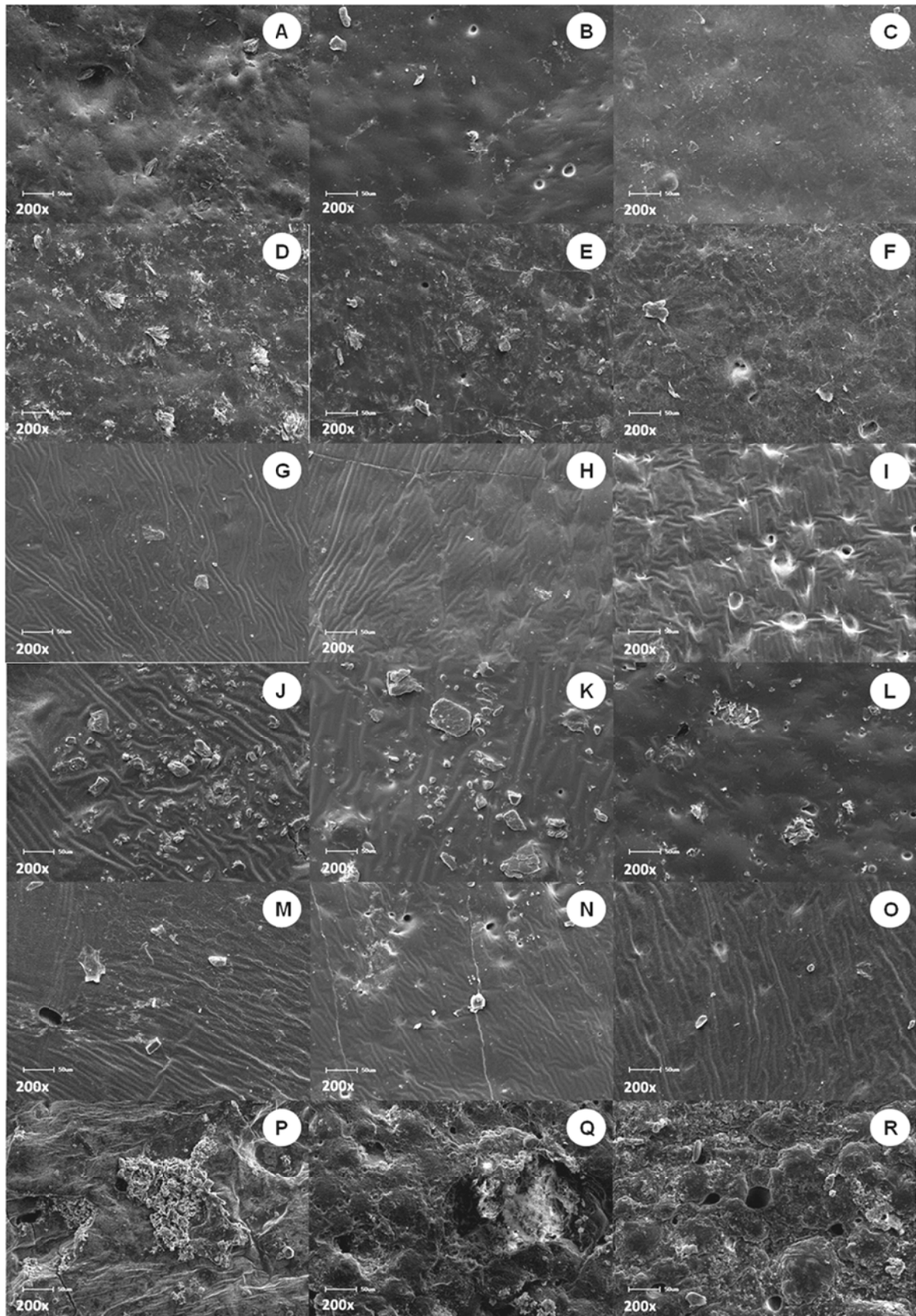
Fonte: A autora

Na coluna esquerda das imagens da Figura 9, todas as partículas dos fármacos podem ser examinadas a uma mesma magnificação (1.000x) para se estabelecer um padrão para comparação. Na coluna direita de imagens, para que fosse possível mensurar o tamanho aproximado das partículas, foram utilizadas maiores (2.400x) ou menores magnificações (200x) no caso dos fármacos apresentarem tamanho de partículas menores (Ni 9B e Ce 9F) ou maiores (Mc 9D, Clx 9H e It 9J), respectivamente.

Os menores tamanhos de partículas observados foram, então, dos fármacos Ni e Ce. As partículas de Ni apresentaram morfologia irregular e formato alongado de tamanhos diversos, menores que 10 μm (Figuras 9A e 9B). As partículas de Ce apresentaram formas mais arredondadas, sendo algumas de tamanho muito reduzido, no máximo de 15 μm (Figura 9E e 9F). O fármaco Mc apresentou partículas de formato mais alongado que as da Ni, também de tamanhos diversos de até 200 μm (Figura 9C e 9D). O fármaco It apresentou partículas mais volumosas com característica irregular como se apresentasse espículas em sua superfície, com uma área máxima de até 150 μm^2 (Figura 9I e 9J). A Clx apresentou as partículas mais volumosas com característica mais lisa e área de superfície de até 150 μm^2 (Figura 9G e 9H).

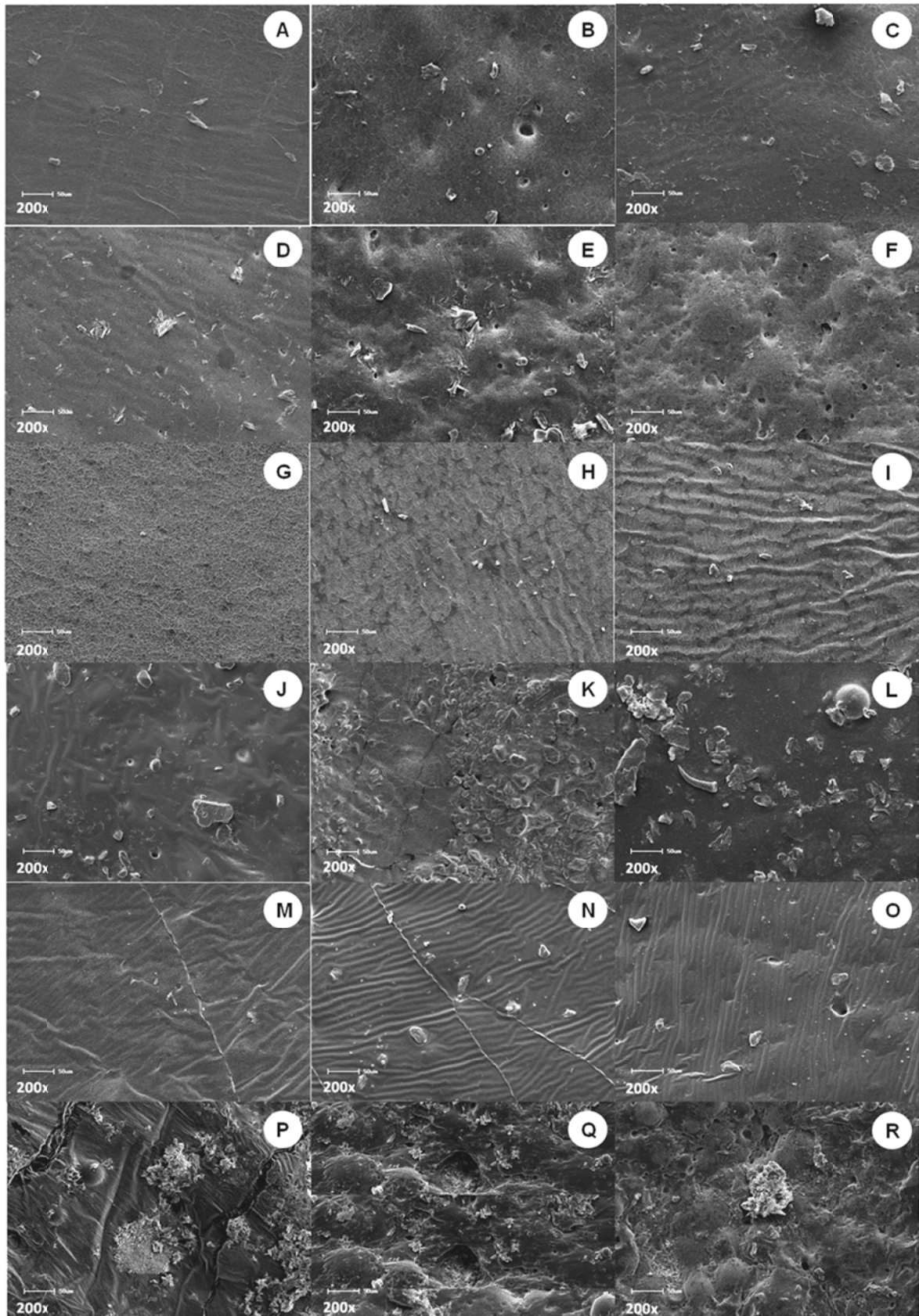
As Figuras 10 e 11 ilustram micrografias dos corpos de prova de todos os grupos experimentais nos períodos de imersão de 24 h, sete e 14 dias dos materiais Softone e Trusoft, respectivamente.

FIGURA 10 – Imagens em MEV do condicionador de tecido Softone após 24 h (1ª coluna), 7 dias (2ª coluna) e 14 dias (3ª coluna). **A a C** – controle; **D a F** – Ni-S; **G a I** – Mc-S; **J a L** – Ce-S; **M a O** – Clx-S e **P a R** – It-S



Fonte: A autora

FIGURA 11 – Imagens em MEV do reembasador resiliente Trusoft após 24 h (1ª coluna), 7 dias (2ª coluna) e 14 dias (3ª coluna). **A a C** – controle; **D a F** – Ni-T; **G a I** – Mc-T; **J a L** – Ce-T; **M a O** – Clx-T e **P a R** – It-T



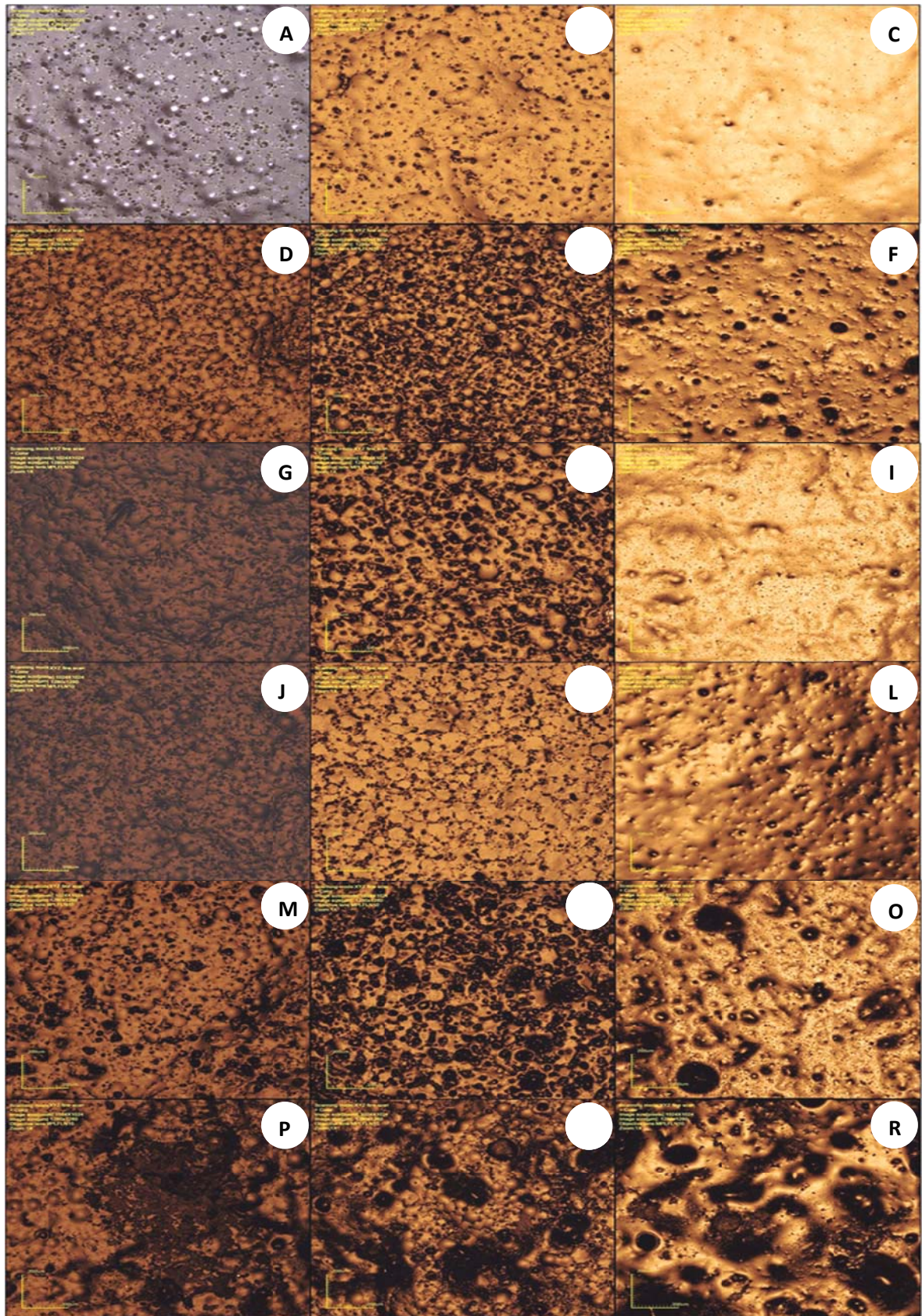
Fonte: A autora

Todas as imagens em MEV obtidas no presente estudo mostraram que os espécimes contendo antifúngicos demonstraram características de superfície com morfologias diferentes dos grupos controle sem adição de fármaco (Figuras 10 e 11). Algumas superfícies se apresentaram também com alterações macroscópicas como as observadas nas amostras de Ni que tiveram alteração de cor de rósea para alaranjada (Figuras 1E e 2A). Além da visualização das partículas de coloração branca do It na superfície dos corpos de prova (Figura 1F).

5.2 MICROSCOPIA CONFOCAL LASER PARA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE

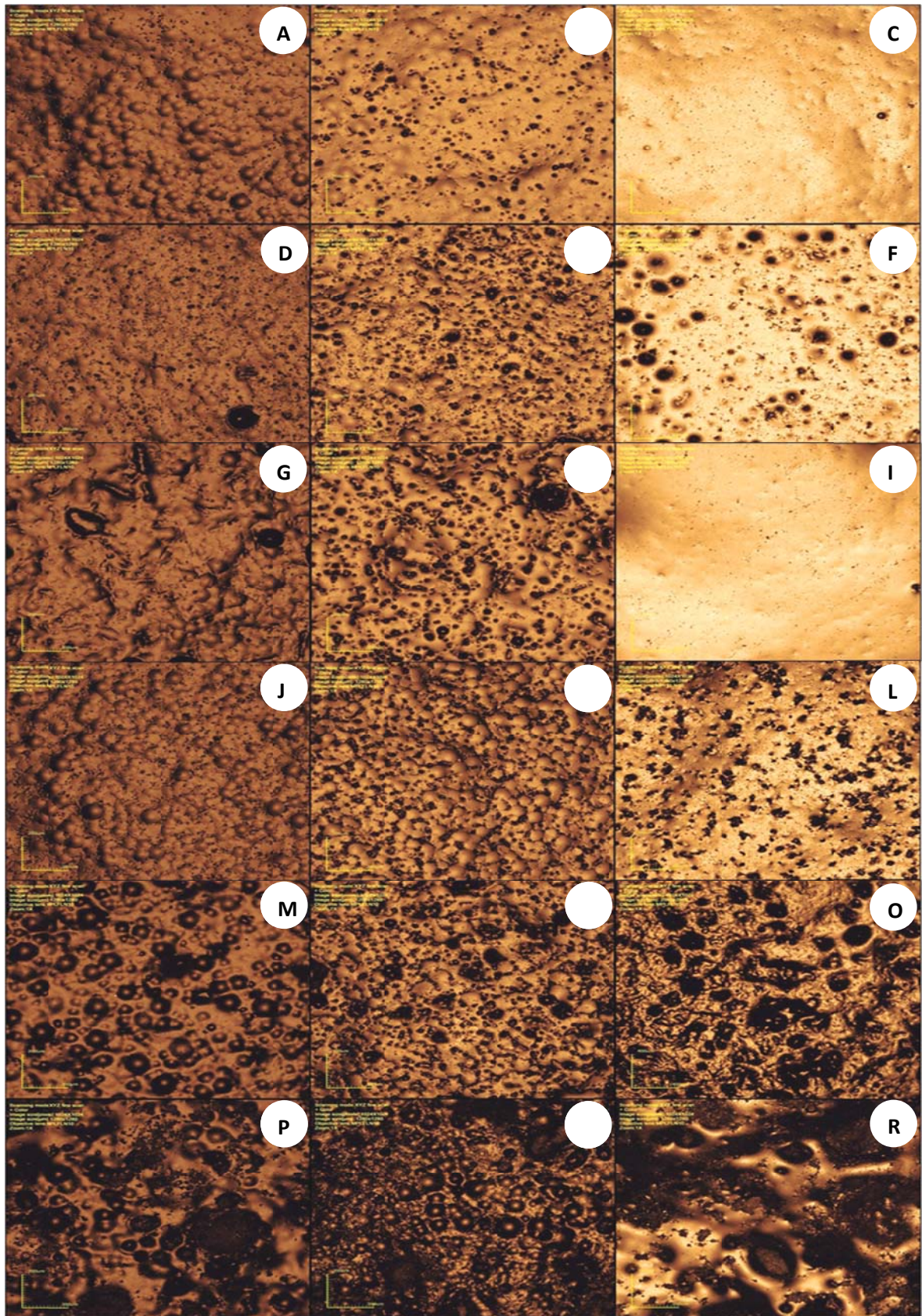
Nas Figuras 12 e 13, estão ilustradas imagens em microscopia confocal laser de corpos de prova de todos os grupos experimentais nos períodos de imersão de 24 h, sete e 14 dias dos materiais Softone e Trusoft, respectivamente.

FIGURA 12 – Imagens em microscopia confocal laser do condicionador de tecido Softone após 24 h (1ª coluna), 7 dias (2ª coluna) e 14 dias (3ª coluna). **A a C** – controle; **D a F** – Ni-S; **G a I** – Mc-S; **J a L** – Ce-S; **M a O** – Clx-S e **P a R** – It-S



Fonte: A autora

FIGURA 13 – Imagens em microscopia confocal laser do reembasador resiliente Trusoft após 24 h (1ª coluna), 7 dias (2ª coluna) e 14 dias (3ª coluna). **A a C** – controle; **D a F** – Ni-T; **G a I** – Mc-T; **J a L** – Ce-T; **M a O** – Clx-T e **P a R** – It-T



Fonte: A autora

De acordo com as imagens obtidas, os grupos controles dos materiais macios apresentaram características de superfície semelhantes. Após 24 h de imersão, apresentaram topografia irregular contendo pérolas e pequenos poros distribuídos pela superfície (Figuras 12A e 13A). Aos sete dias, foi observada a diminuição da quantidade de pérolas, as quais também se tornaram mais sutis mas, em contrapartida, houve um aumento na quantidade e tamanho dos poros distribuídos pela superfície (Figuras 12B e 13B). Em 14 dias, apresentaram superfícies lisas, porém, com aspecto de entumescimento (Figuras 12C e 13C).

Todos os espécimes com incorporação de antifúngicos apresentaram morfologia de superfície diferente quando comparados aos grupos controle em todos os tempos de imersão. Apenas os grupos contendo Mc (Figuras 12G a 12I e 13G a 13I) tiveram um comportamento mais próximo aos grupos controle, entretanto, apresentaram superfície mais irregular aos sete dias. Os grupos Mc-S e Mc-T apresentaram pérolas e poros de menor tamanho em 24 h (Figuras 12G e 13G); aumento do tamanho e quantidade de poros aos sete dias (Figuras 12H e 13H) e aspecto liso e entumescido de suas superfícies aos 14 dias (Figuras 12I e 13I).

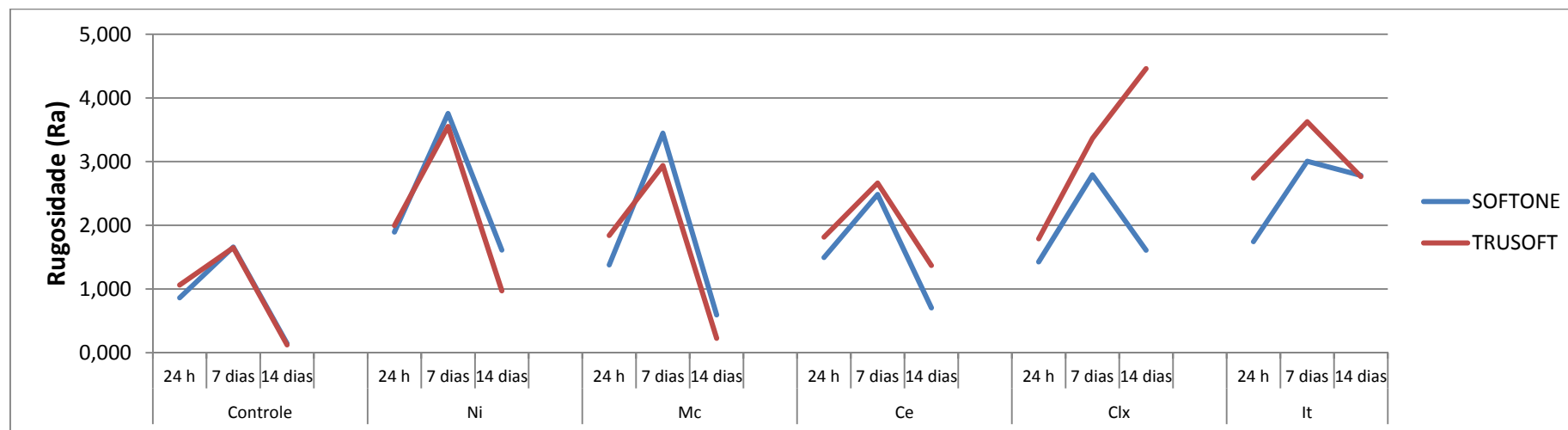
Os corpos de prova modificados pela adição de Ni, após 24 h (Figuras 12D e 13D), demonstraram pérolas e pequenos poros distribuídos pela superfície. Ainda apresentaram pérolas e esses poros aumentaram em quantidade e tamanho após sete dias (Figuras 12E e 13E). E em 14 dias, os poros aumentaram seu diâmetro (Figuras 12F e 13F). Para os grupos com incorporação de Ce, pérolas e poros também foram observados em 24 h (Figuras 12J e 13J). Uma superfície plana e porosa foi apresentada pelos os espécimes de Softone após sete dias de imersão em água (Figura 12K). Para os espécimes de Trusoft, observou-se uma diminuição da quantidade de pérolas e um aumento da de poros em sete dias (Figura 13K). Aos 14 dias, o material Softone modificado por Ce apresentou uma superfície entumescida e os poros também foram maiores (Figura 12L). E uma superfície mais plana, porém, contendo pequenos poros foi demonstrada pelo grupo Ce-T (Figura 13L).

Os grupos contendo Clx e It apresentaram as maiores alterações na sua morfologia de superfície (Figuras 12M a 12R e 13M a 13R). Os grupos modificados por Clx apresentaram pérolas em sua superfície após 24 h (Figuras 12M e 13M),

sendo que o condicionador de tecido também apresentou uma quantidade maior de poros distribuídos por sua superfície (Figura 12M). Houve um aumento na quantidade e tamanho dos poros após sete dias para ambos os materiais (Figuras 12N e 13N), tendo sido mais acentuado para o Softone (Figura 12N). Após 14 dias, a superfície do material Softone mostrou-se mais lisa, com aspecto de entumecimento, porém, porosa (Figura 12O) e a superfície do reembasador Trusoft apresentou-se irregular e com maior quantidade de poros (Figura 13O). Os espécimes com adição de It demonstraram relevo totalmente irregular, contendo pérolas, poros e espículas após 24 h (Figuras 12P e 13P) e sete dias, sendo que aos sete dias foi ainda mais irregular (Figuras 12Q e 13Q). Aos 14 dias, apresentaram superfície entumecida, irregular, contendo espículas e grandes poros (Figuras 12R e 13R).

Os resultados de rugosidade média (Ra) podem ser visualizados na Figura 14.

FIGURA 14 – Valores de rugosidade média (Ra) obtidos para os materiais Softone e Trusoft em todos os grupos experimentais



Fonte: A autora

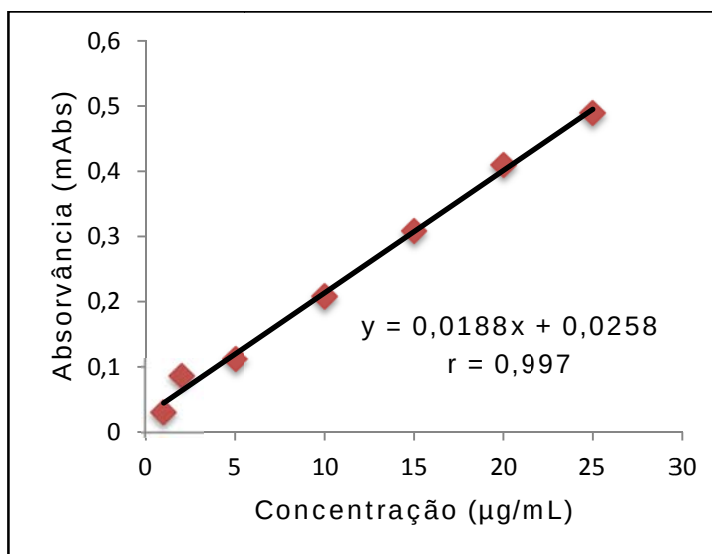
Como pode ser observado na Figura 14, foram obtidos valores superiores de rugosidade para todos os espécimes modificados pela incorporação de antifúngicos em relação aos grupos controle em todos os tempos de armazenamento em água destilada. Houve uma tendência de aumento da Ra após sete dias e, na sequência, uma diminuição a valores inferiores aos iniciais (24 h) após 14 dias de imersão dos espécimes dos grupos controles e modificados pela adição de Ni, Mc e Ce. Também houve uma tendência a aumento em sete dias e redução em 14 dias, entretanto a valores superiores aos obtidos em 24 h para os grupos Clx-S, It-S e It-T. Finalmente, foi observada uma ascendência dos valores de Ra para o grupo Clx-T após sete e 14 dias em água.

5.3 LIBERAÇÃO IN VITRO

5.3.1 Diacetato de clorexidina

Considerando as três curvas analíticas elaboradas para a determinação quantitativa do diacetato de clorexidina por espectrofotometria UV-Vis, a avaliação do parâmetro de linearidade resultou em um valor de coeficiente de correlação (r) médio de 0,997, indicando uma correlação linear significativa. A Figura 15 ilustra a curva analítica média obtida para a quantificação do fármaco Clx em solução de metanol. A equação da reta gerada relaciona os valores de absorvância em UV-Vis às concentrações de Clx nas amostras.

FIGURA 15 – Representação gráfica da curva analítica padrão para a quantificação de Clx obtida por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 480$ nm)

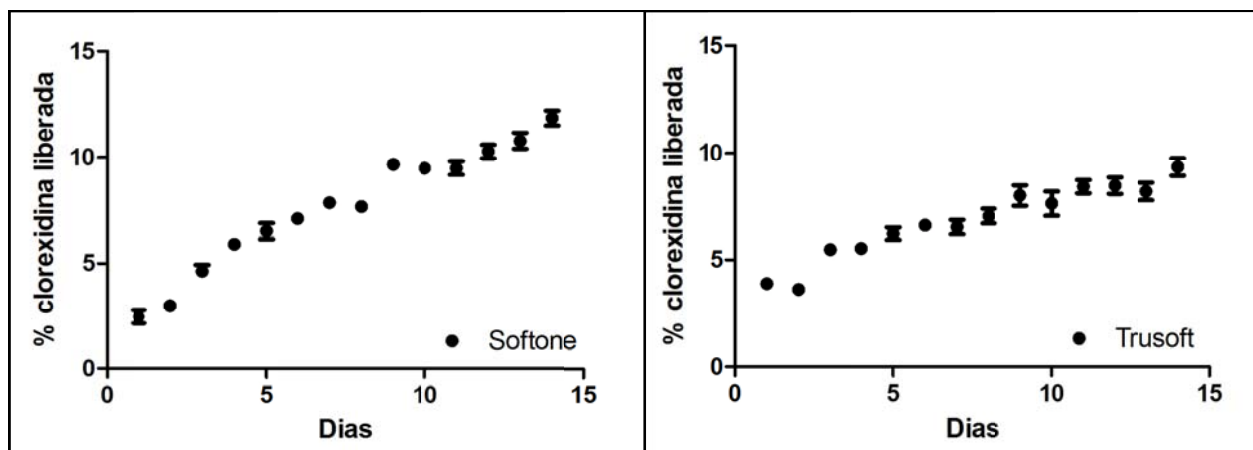


Fonte: A autora

A partir da equação de reta gerada pela curva de calibração, foram obtidos os resultados da liberação diária ($\mu\text{g/mL}$) de Clx a partir de ambos os materiais. A maior concentração liberada foi observada no primeiro dia de análise e, ao final dos 14 dias, o condicionador de tecido Softone liberou em média $593,3 \mu\text{g/mL}$ e o reembasador resiliente Trusoft, $521,2 \mu\text{g/mL}$.

O perfil ajustado de liberação in vitro de Clx a partir dos materiais Softone e Trusoft foi obtido plotando-se a porcentagem liberada em função do tempo (Figura 16).

FIGURA 16 – Perfil de liberação in vitro de Clx a partir de ambos os materiais durante 14 dias



Fonte: A autora

Os dados de modelagem matemática revelaram que a melhor cinética para ambos os materiais foi explicada pelo modelo biexponencial (Tabela 5), sendo que os materiais apresentaram uma primeira etapa de liberação rápida (α) e uma segunda etapa de liberação lenta ou controlada (β).

Tabela 5. Modelagem matemática pela equação biexponencial para ambos os materiais contendo Clx

Material	MSC	r	α (min^{-1})	β (min^{-1})
Softone	3,41	0,991	0,0053	0,3297
Trusoft	2,50	0,976	0,2389	0,0026

Fonte: A autora

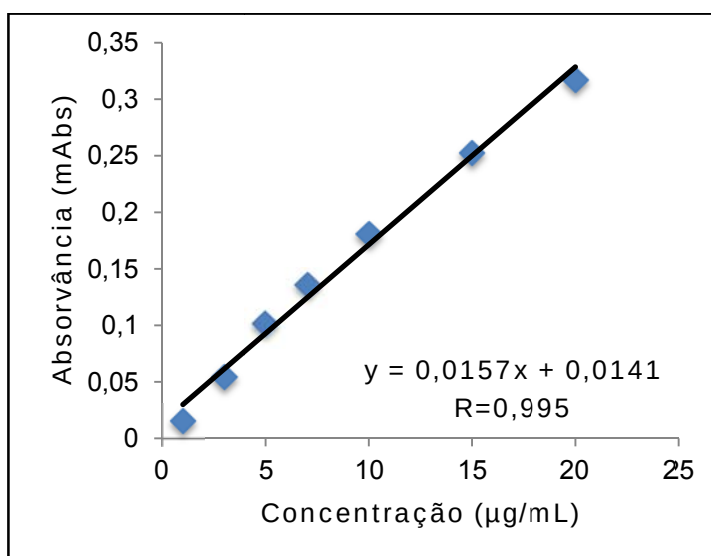
Os valores de n segundo o teste de Korsmeyer-Peppas para os materiais Softone e Trusoft foram 0,6 e 0,36, respectivamente.

5.3.2 Nistatina

Considerando as três curvas analíticas elaboradas para a determinação quantitativa da nistatina por espectrofotometria UV-Vis, a avaliação do parâmetro de linearidade resultou em um valor de coeficiente de correlação (r) médio de 0,995, indicando uma correlação linear significativa. A Figura 17 ilustra a curva analítica

média obtida para a quantificação do fármaco Ni em solução de metanol/dimetilformamida. A equação da reta gerada relaciona os valores de absorvância em UV-Vis às concentrações de Ni nas amostras.

FIGURA 17 – Representação gráfica da curva analítica padrão para a quantificação de Ni obtida por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 520$ nm)

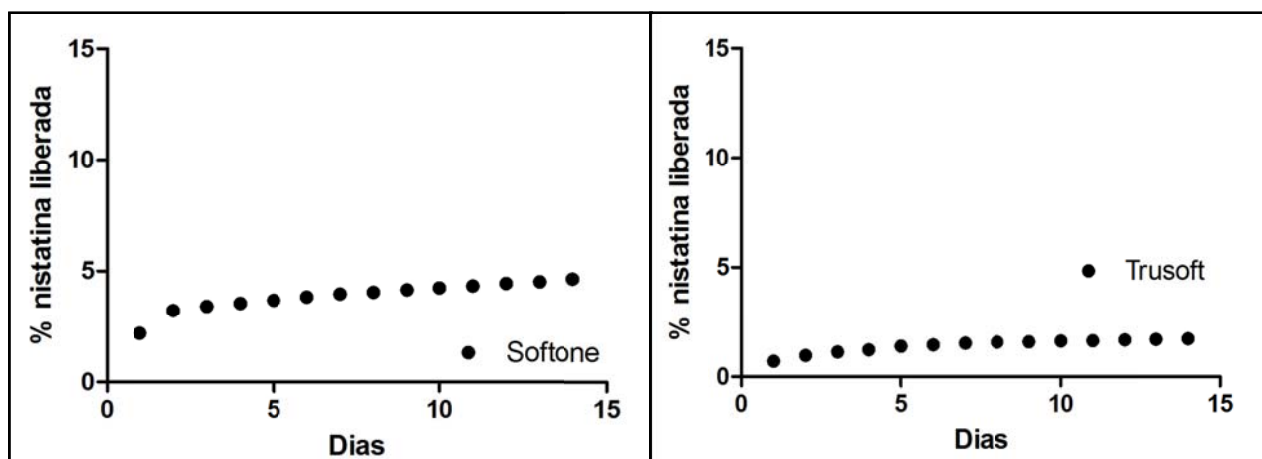


Fonte: A autora

A maior concentração (µg/mL) liberada de Ni também foi observada no primeiro dia de análise e, ao final dos 14 dias, o condicionador de tecido Softone liberou em média 323,6 µg/mL e o reembasador resiliente Trusoft, 88,2 µg/mL.

O perfil ajustado de liberação in vitro de Ni a partir dos materiais Softone e Trusoft foi obtido plotando-se a porcentagem liberada em função do tempo (Figura 18).

FIGURA 18 – Perfil de liberação in vitro de Ni a partir de ambos os materiais durante 14 dias



Fonte: A autora

Os dados de modelagem matemática revelaram que a melhor cinética para ambos os materiais também foi explicada pelo modelo biexponencial (Tabela 6), sendo que os materiais apresentaram uma primeira etapa de liberação rápida (α) e uma segunda etapa de liberação lenta ou controlada (β).

Tabela 6. Modelagem matemática pela equação biexponencial para ambos os materiais contendo Ni

Material	MSC	r	α (min^{-1})	β (min^{-1})
Softone	5,45	0,998	1,7729	0,0011
Trusoft	5,25	0,999	0,0001	0,2967

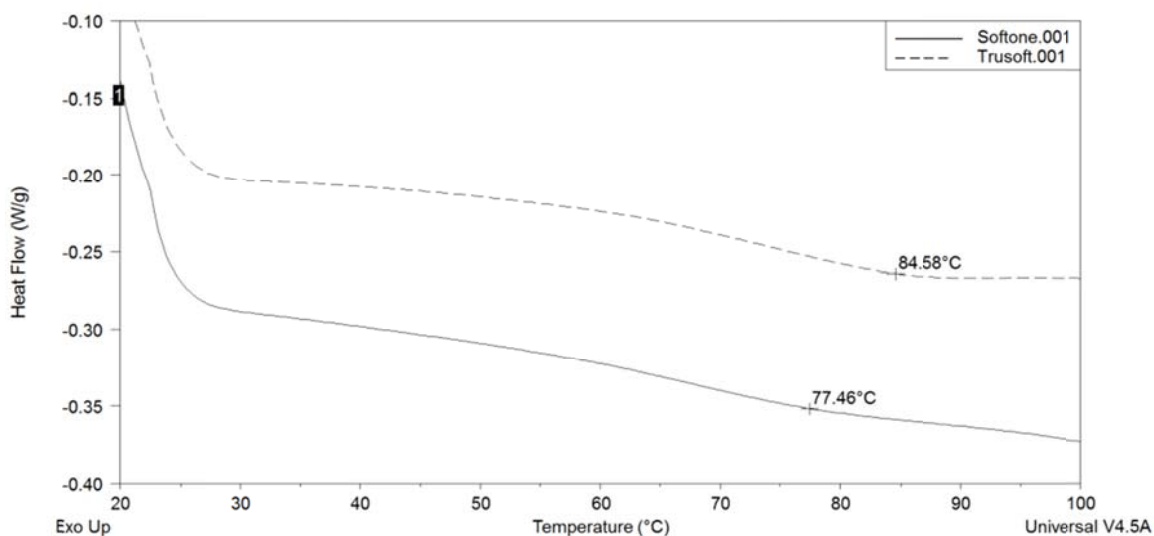
Fonte: A autora

Os valores de n segundo o teste de Korsmeyer-Peppas para os materiais Softone e Trusoft foram 0,22 e 0,29, respectivamente.

5.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

Na Figura 19 pode ser observada a curva de DSC da análise dos materiais macios temporários testados neste estudo. De acordo com esta Figura, é possível constatar uma T_g inferior do condicionador de tecido Softone ($77,46^\circ\text{C}$) em relação ao reembasador resiliente Trusoft ($84,58^\circ\text{C}$).

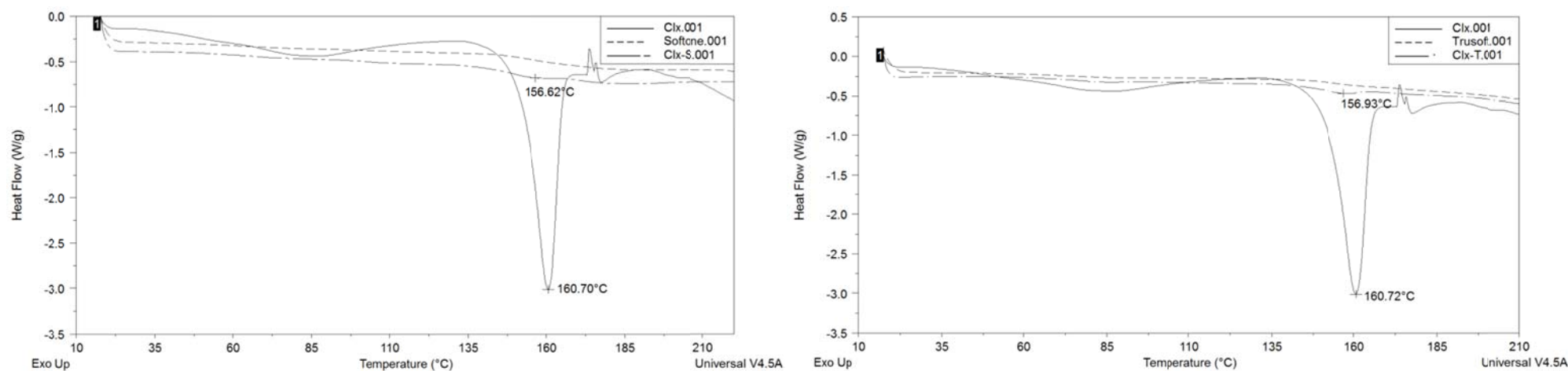
FIGURA 19 – Curva de DSC dos materiais macios temporários Softone e Trusoft



Fonte: A autora

As curvas de DSC da Figura 20 mostram as análises térmicas do fármaco Clx, dos materiais macios controles (sem adição de Clx) e dos materiais modificados pela incorporação de Clx. É possível observar que o pico endotérmico de seu ponto de fusão (160,7°C) pouco se movimentou em relação à deflexão correspondente ao seu ponto de fusão observado nos materiais modificados (156°C).

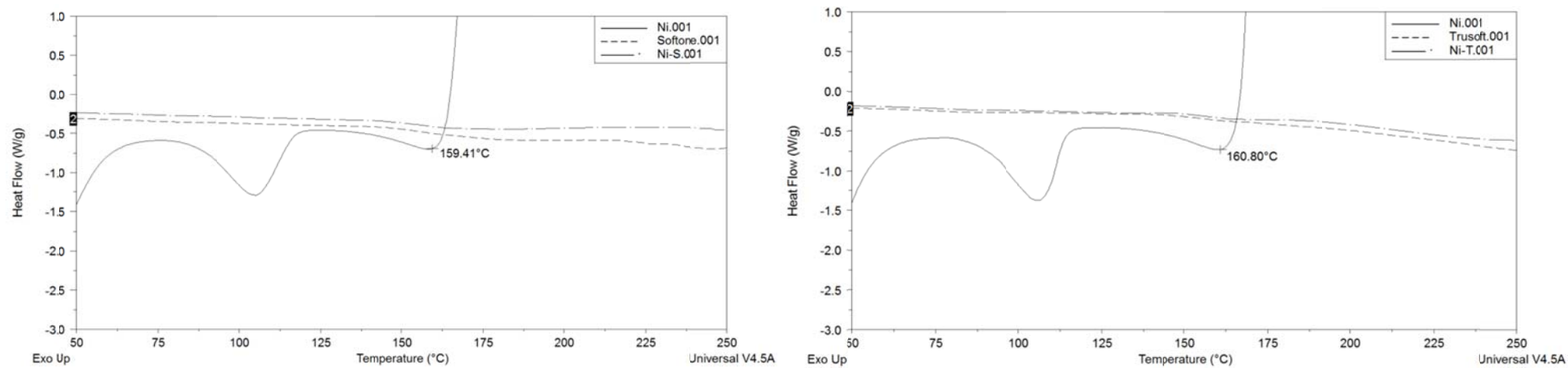
FIGURA 20 – Curva de DSC do fármaco Clx, dos materiais macios sem e com a adição de Clx



Fonte: A autora

As curvas de DSC da Figura 21 mostram as análises térmicas do fármaco Ni, dos materiais macios controles (sem adição de Ni) e dos materiais modificados pela incorporação de Ni. Da mesma forma que para a Clx, o pico endotérmico do ponto de fusão da Ni ($\approx 160^{\circ}\text{C}$) pouco se movimentou nos materiais modificados, entretanto, devido à baixa concentração de Ni adicionada às amostras, pode ser observada apenas uma pequena deflexão nesta faixa de temperatura.

FIGURA 21 – Curva de DSC do fármaco Ni, dos materiais macios sem e com a adição de Ni



Fonte: A autora

6 DISCUSSÃO

A incorporação de fármacos antifúngicos em materiais macios temporários apresenta potencial para se tornar uma modalidade lógica de tratamento para a estomatite protética. Essa terapia possibilita a redução do trauma causado por próteses antigas e condiciona os tecidos paraprotéticos, em associação com o tratamento antifúngico; fatores etiológicos importantes do desenvolvimento da infecção por *Candida* spp. seriam, dessa forma, eliminados simultaneamente. Além disso, favoreceria a manutenção pelo paciente da higiene da prótese reembasada.^{17,64} Entretanto, previamente à utilização desse meio terapêutico alternativo em pacientes portadores de estomatite protética, deve ser obtida uma matriz polimérica modificada pela adição de antifúngicos que, além de ser eficaz na liberação de fármacos e, consequente, inibição do crescimento dos microrganismos relacionados ao desenvolvimento da patologia, também não apresente efeitos deletérios às propriedades estruturais, físicas e mecânicas dos materiais macios.

6.1 ANÁLISE DE SUPERFÍCIE

Tem sido relatado que o perfil de liberação de fármacos está associado a alguns fatores, tais como tamanho da partícula, peso molecular, distribuição e concentração do fármaco no interior da matriz polimérica e suas propriedades de difusão e solubilização no meio. Além das características importantes da própria matriz polimérica utilizada como veículo para liberação, como sua micromorfologia, permeabilidade, porosidade e a interação fármaco-matriz também são fatores que influenciam os padrões de liberação.²⁸

Um estudo preliminar anterior²⁸ avaliou o padrão de incorporação de fármacos antifúngicos (nistatina, miconazol, cetoconazol e diacetato de clorexidina) em concentrações pré-estabelecidas na literatura no condicionador de tecido Softone utilizando MEV e espectroscopia por difração de raios-X. Entretanto, os corpos de prova foram submetidos ao procedimento de cobertura de superfície utilizando uma fina camada de carbono após sua confecção, não sendo imersos em nenhuma solução aquosa. Isso tornou menos complicado este procedimento, uma vez que as amostras não devem apresentar umidade previamente à cobertura. Os

resultados obtidos mostraram que os corpos de prova contendo nistatina apresentaram distribuição uniforme de partículas com formas e tamanhos aleatórios, variando de 10 a 50 μm . As partículas de miconazol dispersas no material se mostraram irregulares, com dimensões entre 25 e 50 μm , enquanto as de cetozonazol eram esféricas e uniformes, variando entre 10 e 25 μm . A análise em MEV exibiu partículas irregulares de clorexidina de até 50 μm . Os autores concluíram que o condicionador de tecido modificado demonstrou diferenças quanto à distribuição e tamanho das partículas dos fármacos antifúngicos adicionados à sua matriz plastificada, mas as concentrações dos fármacos não causaram mudanças morfológicas na superfície do material.

No entanto, no presente estudo foram avaliados a morfologia e o tamanho das partículas dos antifúngicos por MEV e a topografia de superfície dos materiais macios temporários modificados pela adição de nistatina, miconazol, cetozonazol, itraconazol ou diacetato de clorexidina após períodos de imersão em água destilada, utilizando MEV e microscopia confocal laser. Os fármacos em pó foram incorporados manualmente ao pó dos materiais em concentrações estabelecidas pelo estudo de Bueno et al.,^{47,48} o qual determinou as CMI ao biofilme de *C. albicans* desses fármacos comumente utilizados para tratamento da estomatite protética quando incorporados nesses materiais macios temporários. As CMI foram consideradas como as menores concentrações dos antifúngicos capazes de inibir o crescimento do biofilme fúngico ao longo de 14 dias, simulando o período médio de duração de uma terapia antifúngica tópica convencional.^{16,17}

Pode ser observado pelas micrografias dos grupos controle dos materiais macios avaliados, principalmente nas imagens de confocal (Figuras 12A a 12C e 13A a 13C) que ambos apresentam potencial para serem utilizados como matrizes para adição e liberação de fármacos para o meio intraoral, uma vez que são permeáveis aos fluidos e apresentam porosidade,⁹⁴ importantes fatores relacionados ao transporte de fármaco/água através do polímero.⁹⁵

Foi observada uma notória alteração de superfície em ambos os materiais, principalmente nos grupos modificados pela adição de antifúngicos com o aumento do tempo de imersão em água destilada. Desse modo, a primeira hipótese testada foi comprovada, uma vez que a incorporação dos fármacos antifúngicos aos

materiais macios temporários resultou em alterações diversas na sua morfologia de superfície. Um dos fatores associados com essa modificação morfológica está relacionado à degradação dos materiais macios quando imersos em soluções aquosas.⁹⁶ Ainda segundo Taylor et al. (2008),⁹⁷ a liberação de álcool e plastificante em água pode resultar em aumento da rugosidade de superfície desses materiais após períodos de imersão. Também é conhecido que a liberação desses componentes acompanhada pela absorção de água para o interior do material macio leva à perda de sua integridade de superfície.^{98,99} Além da inerente degradação do material, as partículas do fármaco quando liberadas para o meio deixam poros e vazios provocando alterações em sua morfologia. Brook e van Noort (1985)⁶⁶ observaram a formação de fendas e canais por onde ocorreria a liberação do medicamento para a cavidade oral.

Idealmente, os materiais macios para base de prótese deveriam apresentar superfícies lisas para prevenir a formação de biofilme e consequente inflamação da mucosa oral, bem como para facilitar sua higienização,^{100,101,102} embora a rugosidade não seja a única propriedade relacionada à adesão microbiana.¹⁰³ Materiais com maior rugosidade de superfície podem apresentar maior número de leveduras, pois podem servir como um reservatório microbiano, aumentando a resistência às forças de cisalhamento da escovação.¹⁰⁴ Apesar das alterações microscópicas observadas nas imagens, elas poderiam não influenciar os valores de rugosidade dos materiais quando examinados em rugosímetro de bancada. Quando avaliada a rugosidade dos mesmos grupos experimentais deste estudo,^{47,61} ao final de 14 dias em todas as condições avaliadas, a rugosidade dos materiais macios apresentou redução ou não foi alterada pela incorporação dos fármacos, exceto para o Softone modificado por itraconazol e diacetato de clorexidina. Neste estudo, os valores de rugosidade fornecidos pelo microscópio confocal mostraram um aumento após sete dias de imersão e uma sequente redução após 14 dias em água destilada para valores até inferiores aos iniciais no caso dos grupos controles e modificados pela adição de nistatina, miconazol e cetoconazol. A redução da rugosidade com a imersão em água pode estar associada a características inerentes ao material bem como à sua composição.¹⁰⁵ De acordo com Garcia et al.,¹⁰⁶ a imersão em água causa uma perda de componentes solúveis, podendo resultar na formação de espaços vazios e poros.¹⁰⁷ Com o tempo, esses poros, responsáveis pela

rugosidade, aumentam de tamanho resultando em crateras; e as bordas dessas crateras, por sua vez, provavelmente diminuem e os espécimes tornam-se lisos.¹⁰⁷ Exatamente o que foi observado neste estudo, como pode ser verificado nas imagens confocais dos grupos controles e modificados pela incorporação de nistatina, miconazol e cetoconazol (Figuras 12A a 12L e 13A a 13L).

No caso do itraconazol, as grandes alterações de superfície observadas podem estar associadas, além dos maiores tamanhos e formatos irregulares de suas partículas (Figuras 9I e 9J) e da maior quantidade adicionada aos materiais,^{47,48} ao processamento deste fármaco, que se apresenta comercialmente disponível na forma de péletes. Mesmo moído e processado em peneira ultrafina, é provável que o pó final do itraconazol ainda tenha apresentado resquícios de péletes. Adicionalmente, apesar de não ter sido mensurada, a absorção de água afetou sua estabilidade dimensional,¹⁰⁸ uma vez que foi observado um nítido aumento de volume desses espécimes modificados, o que também acarretou alterações nas suas características de superfície (Figuras 10 a 13 - P a R).

As alterações de superfície dos grupos contendo diacetato de clorexidina e o aumento de rugosidade observado no estudo de Bueno et al.^{47,61} e na presente investigação para o material Trusoft (Figura 14) estão de acordo com estudos que demonstraram, por meio de análise em MEV, que a adição de acetato de clorexidina aumentou a porosidade de resinas acrílicas e de um condicionador de tecido ao longo do tempo.^{77,109} Addy (1981)⁷⁷ observou que o acetato de clorexidina incorporado a um condicionador de tecido apresentou-se distribuído como partículas dispersas no interior da matriz polimérica, sendo efetivamente liberado em níveis antifúngicos por períodos prolongados, mesmo em baixas dosagens. Quando aplicado superficialmente sobre resinas acrílicas, o diacetato de clorexidina tem mostrado efeitos significativamente maiores na redução do biofilme de *C. albicans* quando comparado a outros fármacos.^{54,110} Apesar de apresentar tamanhos de partículas maiores (Figuras 9G e 9H), foi necessária uma quantidade mais baixa de diacetato de clorexidina como CMI para o biofilme de *C. albicans*^{47,48} e, portanto, este fármaco deveria ser levado em consideração no tratamento da estomatite protética por apresentar algumas vantagens sobre outros antifúngicos. Apresenta ação antimicrobiana de grande espectro, atingindo bactérias e fungos presentes no

biofilme protético, além de exibir significativa substantividade, o que resulta em efetividade em períodos maiores de avaliação.^{54,110,111}

O miconazol apesar de apresentar partículas maiores, porém mais finas (Figuras 9C e 9D), não demonstrou aparente alteração de superfície quando comparado aos grupos controle (Figuras 10 a 13 – G a I). O material modificado mostrou-se mais consistente, sem a presença de poros. Isso pode ser relacionado aos resultados do estudo de Bueno et al.^{47,61} que observou um aumento na dureza Shore A do material Softone modificado com a CMI do miconazol no período de 14 dias de imersão em água. Esse resultado foi atribuído ao menor peso molecular da partícula do miconazol em relação aos outros antifúngicos,²⁸ que permitiria que este fármaco apresentasse maior difusibilidade dentro da matriz polimérica, levando a um maior nível de solvatação.³⁴ Mesmo não tendo demonstrado diferenças na sua morfologia de superfície e redução dos valores de rugosidade assim como nos grupos controles (Figura 14), o aumento de dureza notado para o material modificado pela adição de miconazol inviabiliza sua utilização nesta concentração por não promover conforto ao paciente, absorção de impactos e distribuição uniforme das forças mastigatórias sobre o rebordo residual.

Tanto o cetoconazol como a nistatina apresentaram menores tamanhos de partículas (Figuras 9A e 9B e 9E e 9F) e, quando adicionados aos materiais macios, mostraram distribuição uniforme (Figuras 10 e 11 – D a F e J a L). As partículas, quando em menor quantidade e tamanho, podem se difundir mais facilmente pela matriz polimérica. Particularmente, a nistatina foi adicionada aos materiais utilizando a mais baixa CMI dentre os antifúngicos avaliados por Bueno^{47,48} devido ao seu modo de ação farmacológico, que possui o mais largo espectro de ação entre os antifúngicos disponíveis, sendo considerada fungicida.^{112,113,114}

Como os reembasadores resilientes temporários e os condicionadores de tecido são utilizados por curtos períodos de tempo, tem sido sugerido que as alterações de pequenas dimensões nas propriedades físicas e mecânicas após a incorporação de antimicrobianos^{17,28,49,60,83,84,85} como as observadas nas análises de superfície poderiam não interferir na performance clínica dos materiais^{17,49,85} e não contraindicariam sua utilização pela vantagem no que se refere à liberação do fármaco.^{83,84}

6.2 LIBERAÇÃO IN VITRO

Apesar disso, para este estudo de liberação e para dar sequência a esta linha de pesquisa, foram selecionados apenas os fármacos nistatina e diacetato de clorexidina, os quais foram altamente efetivos na inibição do crescimento de *C. albicans* nas mais baixas CMI⁴⁸ e, como consequência, não resultaram em alterações significantes nas propriedades de dureza,⁶¹ rugosidade,⁶³ resistência à tração,^{59,60} e resistência da união ao descolamento.⁶⁵

Estes dois agentes antifúngicos também apresentaram alta efetividade em outros estudos contra espécies de *Candida* quando adicionados a materiais reembasadores de prótese,^{67,72,75,78} ainda apresentando, no caso da nistatina, concentrações mais baixas que o fluconazol para inibir a adesão celular e o crescimento fúngico⁷² e, no caso da clorexidina, apresentando efeito fungicida em apenas 1 h,⁷⁵ inclusive contra cepas resistentes aos azóis.^{75,78,80}

O fármaco miconazol tem sido amplamente utilizado para o tratamento da estomatite protética como gel tópico. Apesar de aliviar os sinais e sintomas desta patologia, este antifúngico não inibe efetivamente o crescimento de *Candida* spp. na superfície das bases das próteses.⁴ Para superar esta limitação, o miconazol tem sido incorporado em materiais resilientes e apresentado efetividade contra a *C. albicans*.^{69,71} Entretanto, o aumento de dureza Shore A dos materiais Softone e Trusoft observado em estudos anteriores^{47,61} devido à necessidade de adição deste fármaco em uma concentração mais alta para se obter efetividade na inibição de *C. albicans*⁴⁸ resultou na eliminação deste grupo após as últimas análises de morfologia de superfície.

O cetoconazol, utilizado para o tratamento sistêmico da candidose, quando incorporado a materiais macios temporários tem demonstrado efetividade na inibição do crescimento de *C. albicans*⁶⁹ superior à nistatina¹⁴ e ao itraconazol.⁷³ A CMI contra o biofilme de *C. albicans* determinada para este antifúngico adicionado aos materiais Softone e Trusoft foi intermediária em relação aos outros fármacos avaliados no estudo de Bueno et al.⁴⁸ Entretanto, este fármaco também foi excluído do estudo de liberação devido ao fato de ter resultado em alterações na resistência à tração do material Trusoft⁵⁹ e sua toxicidade ter sido apontada como um problema.⁵⁰

O agente antifúngico itraconazol, como relatado previamente, é utilizado para o tratamento e profilaxia de candidose em pacientes imunocomprometidos (British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party, 1992) e como terapia alternativa que não responde ao fluconazol.⁵² Quando adicionado a condicionadores de tecido, o itraconazol tem mostrado comportamentos antagônicos: tanto maior efetividade que o fluconazol e a nistatina na inibição de *C. albicans*⁷⁰ como também não tem resultado em inibição de crescimento fúngico possivelmente devido a uma interação deste fármaco com a matriz polimérica, impedindo sua ação.⁷³ Os resultados dos estudos prévios que avaliaram propriedades físicas e mecânicas dos materiais macios testados neste estudo demonstraram que este antifúngico, adicionado em uma relativamente mais alta CMI⁴⁸, promoveu aumento significativo da rugosidade de superfície⁶³ e valores inferiores aos sugeridos pela literatura para resistência da união ao descolamento com uma resina para base de prótese.⁶⁵ Somado ao fato de que o uso de itraconazol requer monitoramento cuidadoso dos pacientes que fazem uso de outros fármacos devido a potenciais interações medicamentosas sérias,⁵¹ este agente antifúngico também não foi avaliado na segunda parte desta Dissertação.

Para que seja eficaz clinicamente, o fármaco contido em sistemas poliméricos deve ter capacidade de liberação para o meio.^{14,16,17,27,69} Ambos os fármacos avaliados nesta parte do estudo foram liberados para o meio aquoso durante o período avaliado. O diacetato de clorexidina foi liberado em maior concentração que a nistatina e o material Softone apresentou maior capacidade de liberação que o Trusoft, deste modo, tendo sido a segunda hipótese comprovada. Várias são as explicações para este achado, uma vez que diversos fatores estão envolvidos no processo de liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas.²⁸

A nistatina, incorporada aos materiais, apresentou uma efetividade inibitória ao biofilme de *C. albicans* com apenas metade da quantidade (0,032 g) necessária para o diacetato de clorexidina (0,064 g).⁴⁸ Visto que uma menor concentração foi adicionada, menor concentração poderia, então, ser liberada. Outros estudos também observaram essa relação dose-dependente, sendo que a concentração de fármaco liberada foi diretamente proporcional à quantidade adicionada ao polímero.^{55,78,80,81}

Apesar de a nistatina ter apresentado partículas de tamanho mais reduzido que o diacetato de clorexidina (Figura 9), que poderia facilitar sua liberação devido à maior relação área de superfície/volume,¹¹⁵ apresenta um peso molecular mais alto (926,11 *versus* 625,56 da clorexidina).²⁸ Lin et al.⁷⁹ observaram que os fármacos com maior peso molecular necessitam de uma maior energia de ativação para penetrar e se difundir através da matriz polimérica e que a velocidade de liberação dos fármacos pode ser aumentada pela diminuição de seu peso molecular.

Somado à concentração menor e ao peso molecular mais alto, a nistatina também apresenta uma baixa solubilidade em solventes hidrofílicos, resultando em uma liberação mais lenta a partir da matriz polimérica.^{43,81} Tallury et al. (2007)⁸¹ avaliaram a solubilidade em UV de fármacos e encontraram os valores de 20 e 0,715 mg/mL para o diacetato de clorexidina e a nistatina, respectivamente. Devido à insolubilidade da nistatina em água, Lin et al. (2003),⁷⁹ para avaliar sua liberação a partir de um copolímero a base de etileno acetato de vinila, tiveram que utilizar como meio de armazenamento uma solução de água/etanol (4:1). Neste estudo, foi utilizada a solução de água destilada e surfactante lauril sulfato de sódio a 2% para imergir os corpos de prova contendo nistatina. Tallury et al.⁸¹ também adicionaram surfactantes ao meio de imersão dos espécimes modificados pela adição de nistatina e observaram uma maior facilitação de sua liberação com a maior concentração do surfactante. Neste estudo, o surfactante lauril sulfato de sódio foi adicionado ao meio em uma concentração acima da crítica micelar. De acordo com Tallury et al.,⁸¹ acima desta concentração, o surfactante forma micelas que têm a capacidade de aumentar a solubilidade de substâncias pouco solúveis em água. O surfactante também reduz a tensão interfacial entre o polímero e o meio de dissolução, aumentando a dispersabilidade da matriz contendo fármaco permitindo sua liberação. Além de agir causando a entrada do fluido na matriz e, na sequência, dissolvendo e criando canais por onde o fármaco pode ser liberado. Mesmo com a adição do tensoativo, a nistatina foi liberada em baixas concentrações.

O fato da matriz de Softone ter liberado ambos os fármacos em maior quantidade que o Trusoft deve-se ao seu valor mais baixo de temperatura de transição vítrea (Figura 19). Apesar de o fabricante não mencionar a concentração dos plastificantes dos materiais utilizados neste estudo, é esperado, de acordo com a literatura,^{99,116} que o Softone, sendo um condicionador de tecido, apresente maior

quantidade de plastificante que o Trusoft, que é um reembasador resiliente temporário. Os plastificantes reduzem a temperatura de transição vítrea do polímero, tornando o material macio. As moléculas de plastificante quando liberadas para o meio deixam poros no material por onde o fármaco pode ser liberado. A absorção de água do sistema polimérico associada à sua estrutura porosa (Figuras 12 e 13) permite uma liberação controlada do fármaco, podendo auxiliar no tratamento de infecções por *Candida* intratáveis ou persistentes.⁷⁸ A fraca interação detectada entre estes dois fármacos e ambas as matrizes poliméricas, observada pelas deflexões dos picos endotérmicos correspondentes à temperatura de fusão dos fármacos próximas a estas temperaturas quando os fármacos foram analisados na sua forma pura (Figuras 20 e 21), também reforça a possibilidade de utilização destes materiais como veículos para incorporação e liberação de antifúngicos para tratamento da estomatite protética.

A cinética de liberação de ambos os fármacos a partir dos materiais macios avaliados foi biexponencial, sendo que houve uma alta liberação inicial seguida por uma liberação controlada durante 14 dias. Outros estudos também observaram este padrão de liberação: maior nas primeiras 24 h e controlado até o final do estudo.^{58,75,77,78,79,80} Esta liberação consiste de dois estágios. Um inicial que consta de um processo imediato (efeito *burst*) que provavelmente reflete a liberação do fármaco presente na superfície do material. A liberação subsequente pode ser o resultado de um processo complexo envolvendo a formação de gotículas de água ao redor das partículas dos fármacos, em sítios osmoticamente ativos, e a interação dessas gotas com o processo de absorção de água^{58,78,79} e a porosidade do polímero.⁵⁸

De acordo com a lei das potências do modelo semiempírico de Korsmeyer e Peppas, quando os valores de n são inferiores a 0,43, a liberação do fármaco é controlada por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Quando o valor de n é superior a 0,85, a liberação é controlada por inchamento (ou erosão) do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte não-Fickiano).¹¹⁷ Valores intermediários $0,43 < n < 0,85$ indicam comportamentos mistos ou anômalos, envolvendo ambos os fenômenos. Os resultados mostraram que os mecanismos envolvidos na liberação da nistatina a partir de ambos os materiais respeitaram a lei de Fick, ou seja, envolveram apenas o processo de difusão. Isto pode ser

correlacionado aos resultados de Lima⁸⁷, que indicaram que a adição de nistatina não influenciou a sorção de água e solubilidade dos materiais após 14 dias de avaliação, sendo que este fármaco pôde ser liberado sem que houvesse alteração no processo de transporte de fluidos através das matrizes. Para a clorexidina, foram observados comportamentos diferentes entre as matrizes: mecanismo de transporte Fickiano no caso do reembasador resiliente Trusoft e mecanismo anômalo no caso do condicionador de tecidos Softone. Estes dados também podem se relacionar aos obtidos por Lima (2013),⁸⁷ que avaliou espécimes com as mesmas dimensões utilizadas neste estudo de liberação. Este autor observou que, após 14 dias, apenas o material Softone modificado pela incorporação de clorexidina na mesma concentração deste estudo apresentou maior absorção de água em relação aos grupos controles. Isto indica que pode ter havido um inchamento do polímero, que aliado à difusão do fármaco, facilitou a liberação da clorexidina a partir do Softone. Apesar da maior liberação deste fármaco a partir desta matriz, a decorrente alteração volumétrica do material poderia acarretar problemas com relação à estabilidade dimensional da prótese reembasada, necessitando substituição do Softone após uma semana de uso.

Apesar de a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência ser mais sensível e precisa na quantificação de eluatos a partir de materiais poliméricos, foi utilizada em apenas dois estudos que avaliaram a liberação de clorexidina a partir de resinas acrílicas autopolimerizáveis.^{58,82} Salim et al. (2012)⁵⁵ avaliaram a liberação e a atividade antifúngica da clorexidina a partir de um sistema polimérico a base de polietil metacrilato/tetrahidrofurfuril metacrilato pela técnica do bioensaio. Mas a maioria dos estudos de liberação de fármacos a partir de resinas acrílicas e materiais macios temporários foi feita utilizando espectroscopia UV a 220-257,5 nm para a clorexidina e a 306 nm para a nistatina.^{75,77,78,79,80,81} Este estudo quantificou a liberação dos fármacos utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta visível (a 480 nm para a clorexidina e a 520 nm para a nistatina) a partir de reações químicas colorimétricas entre reagentes e grupos funcionais presentes nas moléculas da clorexidina⁸⁸ e da nistatina⁸⁹, permitindo seletividade ao método e linearidade por meio da relação entre a saturação da cor e a concentração presente na amostra.

Não foi encontrado na literatura disponível até o momento, nenhum trabalho que tivesse avaliado a liberação in vitro dos fármacos nistatina e diacetato de clorexidina a partir de materiais macios temporários para base de prótese. Ainda, os trabalhos consultados avaliaram a liberação da nistatina^{79,81} ou da clorexidina^{58,75,78,79,80,81,82} a partir de matrizes poliméricas diferentes das avaliadas neste estudo; a base de polietil metacrilato/tetrahidrofurfuril metacrilato, etileno acetato de vinila ou de polimetil metacrilato, utilizando corpos de prova de dimensões diversas, imersos em volumes diferentes de soluções aquosas, tendo sido o meio substituído ou não em intervalos programados. Isto torna difícil a comparação direta entre resultados, pois resulta em diferentes comportamentos de liberação e solubilização dos fármacos frente às matrizes e ao meio de armazenamento.

Com relação aos valores encontrados neste estudo, pode-se concluir que as quantidades liberadas são seguras e possivelmente não causariam efeitos colaterais ou tóxicos aos pacientes. Efeitos colaterais podem ocorrer durante ou após um tratamento e os possíveis efeitos colaterais causados por fármacos antifúngicos incluem náusea, dor estomacal, diarreia, dor de cabeça e indigestão.¹¹⁸ Entretanto, a utilização de sistemas de liberação local de fármacos reduz o risco de efeitos colaterais sistêmicos ou interações medicamentosas.^{50,55,77,78,82} Efeitos colaterais não são prováveis de ocorrer com a nistatina, que é tolerada mesmo em uma terapia prolongada. A LD50 da nistatina testada em camundongo por via intraperitoneal é de 200 mg/Kg.¹¹⁹ Para a clorexidina, os efeitos colaterais relatados são pigmentação dos dentes e do dorso da língua, descamação e paladar alterado, os quais podem ser diminuídos pela redução da concentração da solução.¹²⁰ Quando ingerida, a clorexidina pode causar irritações gastrintestinais, vômito, tontura, enquanto que a toxicidade sistêmica é rara.¹²¹ Sua LD50 em camundongo por via oral é de 2 g/Kg.¹¹⁹ De acordo com as CMI determinadas,⁴⁸ considerando um reembasamento de uma prótese total maxilar, as quantidades incorporadas dos fármacos aos materiais macios seria de 96 mg (583.584 UI)¹⁸ para a nistatina e 192 mg para o diacetato de clorexidina. Assim, mesmo se toda a quantidade adicionada tivesse sido liberada em 24 h, o sistema de liberação de fármacos proposto neste estudo além de apresentar elevado potencial antifúngico contra *C. albicans*⁴⁸ possivelmente também não

causaria reações alérgicas, uma vez que as concentrações estariam muito abaixo dos níveis tóxicos.^{119,122}

Entretanto, os resultados desta pesquisa in vitro devem ser aplicados às condições clínicas com cautela. Este estudo tem como limitações a dificuldade de simulação do meio aquoso oral com o fluxo e renovação salivar e alteração de temperatura e pH. Para indicar a adição de fármacos antifúngicos em materiais macios temporários para base de próteses, seria necessária uma avaliação final de seu desempenho por meio de estudos clínicos in vivo.

7 CONCLUSÕES

1. Os fármacos nistatina e cetoconazol apresentaram os menores e os fármacos diacetato de clorexidina e itraconazol, os maiores tamanhos de partículas;
2. O condicionador de tecido Softone apresentou morfologia de superfície mais irregular que o reembasador resiliente Trusoft. Foi notada alteração de superfície em ambos os materiais, principalmente naqueles contendo fármacos, com o aumento do tempo de imersão em até 14 dias, sendo que os grupos contendo diacetato de clorexidina e itraconazol demonstraram superfícies extremamente porosas e irregulares;
3. Os espécimes modificados pela adição de fármacos apresentaram valores superiores de rugosidade em relação aos controles e houve uma tendência de aumento de rugosidade aos sete dias, seguida por uma diminuição a valores inferiores aos iniciais aos 14 dias para o grupo controle e aqueles contendo nistatina, miconazol e cetoconazol;
4. Ambos os materiais apresentaram cinética de liberação biexponencial com uma rápida liberação inicial seguida por uma liberação mais lenta, sendo que o material Softone liberou maior concentração dos fármacos que o Trusoft e o diacetato de clorexidina foi liberado em maior concentração que a nistatina, ambos em níveis não tóxicos;
5. A nistatina foi liberada de ambas as matrizes apenas por meio de difusão e a clorexidina foi liberada por difusão a partir do Trusoft e por meio de um mecanismo anômalo a partir do Softone;
6. Foi detectada uma temperatura de transição vítrea inferior para o Softone em relação ao Trusoft;
7. As temperaturas de fusão do diacetato de clorexidina e da nistatina não foram alteradas após terem sido incorporados aos materiais, podendo-se concluir que houve uma fraca ligação química entre estes fármacos e os materiais avaliados.

REFERÊNCIAS

1. AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J**, London, v. 78, n. 922, p. 455-459, Aug. 2002.
2. BARBEAU, J. et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 95, n. 1, p. 51-59, Jan. 2003.
3. COELHO, C. M.; SOUSA, Y. T.; DARE, A. M. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 135-139, Feb. 2004.
4. BANTING, D. W.; HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec Care Dentist**, Chicago, v. 21, n. 1, p. 4-8. 2001.
5. CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 327-335, Jul. 2001.
6. WILLIS, A. M. et al. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 91, n. 3, p. 317-321, Mar. 2001.
7. EVREN, B. A. et al. The association between socioeconomic status, oral hygiene practice, denture stomatitis and oral status in elderly people living different residential homes. **Arch Gerontol Geriatr**, Amsterdam, v. 53, n. 3, p. 252-257, Nov-Dec. 2011.
8. FIGUEIRAL, M. H. et al. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 448-455, Jun. 2007.
9. BANTING, D. W.; GREENHORN, P. A.; MCMINN, J. G. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v. 61, n. 3, p. 199-200, 203-195, Mar. 1995.
10. LOMBARDI, T.; BUDTZ-JORGENSEN, E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. **Eur J Prosthodont Restor Dent**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 17-22, Sep. 1993.
11. TORRES, S. R. et al. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 93, n. 2, p. 149-154, Feb. 2002.

12. BUDTZ-JORGENSEN, E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 82, n. 2, p. 151-190. 1974.
13. NEPPELENBROEK, K. H. et al. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 836-846, Nov. 2008.
14. CARTER, G. M.; KERR, M. A.; SHEPHERD, M. G. The rational management of oral candidosis associated with dentures. **N Z Dent J**, Dunedin, v. 82, n. 369, p. 81-84, Jul. 1986.
15. MATHABA, L. T.; DAVIES, G.; WARMINGTON, J. R. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. **J Med Microbiol**, Reading, v. 42, n. 5, p. 372-379, May. 1995.
16. TRUHLAR, M. R.; SHAY, K.; SOHNLE, P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 71, n. 5, p. 517-524, May. 1994.
17. SCHNEID, T. R. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. **Spec Care Dentist**, Chicago, v. 12, n. 6, p. 245-250, Nov-Dec. 1992.
18. URBAN, V. M. et al. Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. **J Prosthodont**, Hoboken, v. 15, n. 5, p. 295-299, Sep-Oct. 2006.
19. CHAU, V. B. et al. In-depth disinfection of acrylic resins. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 74, n. 3, p. 309-313, Sep. 1995.
20. DAVENPORT, J. C. The denture surface. **Br Dent J**, London, v. 133, n. 3, p. 101-105, Aug. 1972.
21. SATO, M. et al. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. **Aust Dent J**, Sydney, v. 42, n. 5, p. 343-346, Oct. 1997.
22. CHANDRA, J. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 80, n. 3, p. 903-908, Mar. 2001.
23. FERREIRA, M. A. et al. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. **Clin Oral Investig**, Berlin, v. 13, n. 2, p. 237-242, Jun. 2009.

24. KUHN, D. M. et al. Antifungal susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1773-1780, Jun. 2002.
25. MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 34-39, Jan. 2001.
26. BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Effect of growth rate on resistance of Candida albicans biofilms to antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 42, n. 8, p. 1900-1905, Aug. 1998.
27. NIKAWA, H. et al. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against Candida albicans growth and/or acid production. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 350-357, May. 1997.
28. URBAN, V. M. et al. Superficial distribution and identification of antifungal/antimicrobial agents on a modified tissue conditioner by SEM-EDS microanalysis: a preliminary study. **J Prosthodont**, Hoboken, v. 18, n. 7, p. 603-610, Oct. 2009.
29. MCCABE, J. F.; CARRICK, T. E.; KAMOHARA, H. Adhesive bond strength and compliance for denture soft lining materials. **Biomaterials**, Guilford, v. 23, n. 5, p. 1347-1352, Mar. 2002.
30. MURATA, H. et al. Compatibility of tissue conditioners and denture cleansers: influence on surface conditions. **Dent Mater J**, Tokyo, v. 29, n. 4, p. 446-453, Aug. 2012.
31. ISO. **International Organization for Standardization: Specification 10139-1: resilient lining materials for removable dentures - part 1 - short-term materials**. Switzerland: ISO, 1991.
32. ISO. **International Organization for Standardization: Specification 10139-2: soft lining materials for removable dentures - part 2 - materials for long-term use**. Switzerland: ISO, 1999.
33. JONES, D. W. et al. Chemical and molecular weight analyses of prosthodontic soft polymers. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 70, n. 5, p. 874-879, May. 1991.
34. JONES, D. W. et al. Dental soft polymers: plasticizer composite and leachability. **Dent Mater**, Kidlington, v. 4, n. 1, p. 1-7, Feb. 1988.
35. PARKER, S.; BRADEN, M. Effect of composition on the gelation of tissue conditioners. **Biomaterials**, Guilford, v. 17, n. 18, p. 1827-1832, Sep. 1996.

36. PARKER, S.; BRADEN, M. Formulation of tissue conditioners. **Biomaterials**, Guilford, v. 11, n. 8, p. 579-584, Oct. 1990.
37. MAKILA, E.; HOPUSU-HAVU, V. K. Mycotic growth and soft denture lining materials. **Acta Odontol Scand**, London, v. 35, n. 4, p. 197-205. 1977.
38. GRAHAM, B. S. et al. In vivo fungal presence and growth on two resilient denture liners. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 65, n. 4, p. 528-532, Apr. 1991.
39. NIKAWA, H. et al. In vitro evaluation of Candida albicans adherence to soft denture-lining materials. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 68, n. 5, p. 804-808, Nov. 1992.
40. MAKILA, E.; HONKA, O. Clinical study of a heat-cured silicone soft lining material. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 199-204, Apr. 1979.
41. HARRISON, A.; BASKER, R. M.; SMITH, I. S. The compatibility of temporary soft materials with immersion denture cleansers. **Int J Prosthodont**, Lombard, v. 2, n. 3, p. 254-258, May-Jun. 1989.
42. NIKAWA, H. et al. Effects of denture cleansers on direct soft denture lining materials. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 72, n. 6, p. 657-662, Dec. 1994.
43. DOUGLAS, W. H.; WALKER, D. M. Nystatin in denture liners--an alternative treatment of denture stomatitis. **Br Dent J**, London, v. 135, n. 2, p. 55-59, Jul. 1973.
44. MATSUURA, T. et al. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. **J Dent**, Kidlington, v. 25, n. 5, p. 373-377, Sep. 1997.
45. HOAD-REDDICK, G.; GRANT, A. A.; GRIFFITHS, C. S. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 64, n. 1, p. 48-52, Jul. 1990.
46. NEPPELENBROEK, K. H. et al. Efetividade da incorporação de agentes antimicrobianos em condicionador tecidual na inibição de colonização microbiana. **Braz Oral Res**, São Paulo, v. 20, p. 193, set. 2006.
47. BUENO, M. G. **Avaliação microbiológica, física e mecânica de materiais resilientes modificados pela adição de antimicrobianos para tratamento de estomatite protética**. 2011, 211 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.
48. BUENO, M. et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the Candida albicans biofilm. **Oral Dis**, Copenhagen, 2013.

49. DOUGLAS, W. H.; CLARKE, D. A. Physical and mechanical properties of nystatin-containing denture liners. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 34, n. 4, p. 428-434, Oct. 1975.
50. GEERTS, G. A.; STUHLINGER, M. E.; BASSON, N. J. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 664-669, Sep. 2008.
51. KOKS, C. H. et al. Itraconazole solution: summary of pharmacokinetic features and review of activity in the treatment of fluconazole-resistant oral candidosis in HIV-infected persons. **Pharmacol Res**, v. 46, n. 2, p. 195-201, Aug. 2002.
52. MENON, T. et al. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. **Acta Trop**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 151-154, Oct 22. 2001.
53. GOMES, B. P. et al. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 100, n. 4, p. 512-517, Oct. 2005.
54. REDDING, S. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 107, n. 5, p. 669-672, May. 2009.
55. SALIM, N. et al. Fungicidal amounts of antifungals are released from impregnated denture lining material for up to 28 days. **J Dent**, Kidlington, v. 40, n. 6, p. 506-512, Jun. 2012.
56. DAGISTAN, S. et al. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, *Candida*, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. **Mycoses**, Berlin, v. 52, n. 3, p. 266-271, May. 2009.
57. THURMOND, J. M. et al. Oral *Candida albicans* in bone marrow transplant patients given chlorhexidine rinses: occurrence and susceptibilities to the agent. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 72, n. 3, p. 291-295, Sep. 1991.
58. RYALAT, S.; DARWISH, R.; AMIN, W. New form of administering chlorhexidine for treatment of denture-induced stomatitis. **Ther Clin Risk Manag**, Albany, v. 7, n., p. 219-225. 2011.
59. GALITESI, L. L. et al. **Resistência à tração de reembasador temporário modificado com antimicrobianos**. 25º Congresso Odontológico de Bauru. Bauru, 2012. p. 301.

60. NEPPELENBROEK, K. H. et al. **Ultimate tensile strength of temporary liners after addition of antimicrobials**. Sixth International Association for Dental Research Pan-European Region Meeting (IADR/PER). Helsinki, 2012. p. 225.
61. BUENO, M. G. et al. **Hardness of temporary liners modified by antimicrobial MICs for *C. albicans***. IADR 90th General Session. Foz do Iguaçu, 2012. p. 750.
62. URBAN, V. M. et al. Effect of the addition of antimicrobial agents on Shore A hardness and roughness of soft relined materials. **J Prosthodont**, Hoboken. Accepted for publication, 2014.
63. NEPPELENBROEK, K. H. et al. **Incorporation of fungal MICs on roughness of denture liners**. IADR 90th General Session. Foz do Iguaçu, 2012. p. 758.
64. ALCANTARA, C. S. et al. Peel bond strength of resilient liner modified by the addition of antimicrobial agents to denture base acrylic resin. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 20, n. 6, p. 607-612, Nov-Dec. 2012.
65. PELLISSARI, C. V. G. et al. **Resistência da união ao descolamento entre reembasadores resilientes com adição de antimicrobianos e resina acrílica para base de prótese**. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia. Aguas de Lindoia, 2013. p. 288.
66. BROOK, I. M.; VAN NOORT, R. Drug release from acrylic polymers via channels and cracks: in vitro studies with hydrocortisone. **Biomaterials**, Guilford, v. 6, n. 4, p. 281-285, Jul. 1985.
67. THOMAS, C. J.; NUTT, G. M. The in vitro fungicidal properties of Visco-gel, alone and combined with nystatin and amphotericin B. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 167-172, Apr. 1978.
68. LAMB, D. J.; MARTIN, M. V. An in vitro and in vivo study of the effect of incorporation of chlorhexidine into autopolymerizing acrylic resin plates upon the growth of *Candida albicans*. **Biomaterials**, v. 4, n. 3, p. 205-209, Jul. 1983.
69. QUINN, D. M. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 177-182, Mar. 1985.
70. CHOW, C. K.; MATEAR, D. W.; LAWRENCE, H. P. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. **Gerodontology**, v. 16, n. 2, p. 110-118, Dec. 1999.

71. RADNAI, M. et al. Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of *Candida albicans*. **Gerodontology**, v. 27, n. 4, p. 292-296, Dec. 2010.
72. FALAH-TAFTI, A. et al. A comparison of the efficacy of nystatin and fluconazole incorporated into tissue conditioner on the in vitro attachment and colonization of *Candida albicans*. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 7, n. 1, p. 18-22, Winter. 2010.
73. GUPTA, H. et al. An innovative method of incorporating antifungal agents into tissue conditioners: an in vitro study. **Trends Biomater Artif Organs**, v. 25, n. 2, p. 63-66. 2011.
74. CHOPDE, N. et al. In vitro antifungal activity of two tissue conditioners combined with nystatin, miconazole and fluconazole against *Candida albicans*. **J Contemp Dent Pract**, v. 13, n. 5, p. 695-698, Sep-Oct. 2012.
75. SALIM, N. et al. Candidacidal effect of fluconazole and chlorhexidine released from acrylic polymer. **J Antimicrob Chemother**, London, v. 68, n. 3, p. 587-592, Mar. 2013.
76. SALIM, N. et al. Chlorhexidine-impregnated PEM/THFM polymer exhibits superior activity to fluconazole-impregnated polymer against *Candida albicans* biofilm formation. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 193-196, Feb. 2013.
77. ADDY, M. In vitro studies into the use of denture base and soft liner materials as carriers for drugs in the mouth. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 131-142, Mar. 1981.
78. PATEL, M. P. et al. A polymeric system for the intra-oral delivery of an anti-fungal agent. **Biomaterials**, Guilford, v. 22, n. 17, p. 2319-2324, Sep. 2001.
79. LIN, D. M. et al. A polymeric device for delivery of anti-microbial and anti-fungal drugs in the oral environment: effect of temperature and medium on the rate of drug release. **Dent Mater**, Kidlington, v. 19, n. 7, p. 589-596, Nov. 2003.
80. GONG, K. et al. Controlled release of chlorhexidine diacetate from a porous methacrylate system: supercritical fluid assisted foaming and impregnation. **J Pharm Sci**, Hoboken, v. 96, n. 8, p. 2048-2056, Aug. 2007.
81. TALLURY, P. et al. Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial, and antifungal drugs on their release rates from ethylene vinyl acetate copolymer. **Dent Mater**, Kidlington, v. 23, n. 8, p. 977-982, Aug. 2007.

82. AMIN, W. M. et al. A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis. **Eur J Dent**, v. 3, n. 4, p. 257-266, Oct. 2009.
83. ADDY, M.; HANDLEY, R. The effects of the incorporation of chlorhexidine acetate on some physical properties of polymerized and plasticized acrylics. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 155-163, Mar. 1981.
84. THAW, M.; ADDY, M.; HANDLEY, R. The effects of drug and water incorporation upon some physical properties of cold cured acrylic. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v. 15, n. 1, p. 29-36, Jan. 1981.
85. SALIM, N. et al. Impregnation with antimicrobials has an impact on degree of conversion and colour stability of acrylic liner. **Dent Mater J**, Tokyo, v. 31, n. 6, p. 1008-1013. 2012.
86. SALIM, N. et al. Impregnation with antimicrobials challenge bonding properties and water sorption behaviour of an acrylic liner. **J Dent**, Kidlington, v. 40, n. 8, p. 693-699, Aug. 2012.
87. LIMA, J. F. M. **Efeito da incorporação de agentes antimicrobianos sobre propriedades físicas de materiais resilientes temporários para base de prótese**. 2013, 150 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.
88. HOLBROOK, A. The determination of small quantities of chlorhexidine in pharmaceutical preparations. **J Pharm Pharmacol**, West Sussex, v. 10, n. 6, p. 370-374, Jun. 1958.
89. AMER, M. M.; HABEEB, A. A. New colorimetric method for the determination of nystatin. **Talanta**, v. 22, p. 605-607. 1975.
90. URBAN, V. M. et al. Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside relined resins. **Dent Mater**, Kidlington, v. 25, n. 5, p. 662-671, May. 2009.
91. ISO. **International Organization for Standardization: Specification 1567: denture base polymers**. Switzerland: ISO, 1998.
92. ABDOL, H. M. **Dissolution, bioavailability & bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989. 554 p.
93. KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. In: ROSEMAN, T. J.; MANSDORF, S. Z. (Eds.).

Controlled release delivery systems. New York: Marcel Dekker Inc., 1981. p. 77-90.

94. BAKER, R. W.; LONSDALE, H. K. Controlled release: mechanisms and rates. **Adv Exp Med Biol**, v. 47, p. 15-69. 1974.

95. PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Curr Opin Chem Biol**, v. 5, p. 447-451. 2001.

96. ELIAS, C. N.; HENRIQUES, F. Q. Effect of thermocycling on the tensile and shear bond strengths of three soft liners to a denture base resin. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 15, n. 1, p. 18-23, Feb. 2007.

97. TAYLOR, R. L. et al. Colonization and deterioration of soft denture lining materials in vivo. **Eur J Prosthodont Restor Dent**, Mumbai, v. 16, n. 2, p. 50-55, Jun. 2008.

98. ELLIS, B.; LAMB, D. J.; AL-NAKASH, S. Water sorption by a soft liner. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 56, n. 12, p. 1526, Dec. 1977.

99. SINGH, K. et al. Study of the effect of surface treatment on the long term effectiveness of tissue conditioner. **J Oral Sci**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 261-265, Jun. 2010.

100. QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C. M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. **J Clin Periodontol**, Malden, v. 22, n. 1, p. 1-14, Jan. 1995.

101. VERRAN, J.; MARYAN, C. J. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 77, n. 5, p. 535-539, May. 1997.

102. RADFORD, D. R.; CHALLACOMBE, S. J.; WALTER, J. D. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. **Crit Rev Oral Biol Med**, Alexandria, v. 10, n. 1, p. 99-116. 1999.

103. PAVAN, S. et al. Colonisation of soft lining materials by micro-organisms. **Gerodontology**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 211-216, Sep. 2010.

104. PEREIRA-CENCI, T. et al. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 16, n. 2, p. 86-94, Mar-Apr. 2008.

105. PISANI, M. X. et al. Evaluation of experimental cleanser solution of *Ricinus communis*: effect on soft denture liner properties. **Gerodontology**, Oxford, v. 29, n. 2, p. e179-185, Jun. 2012.
106. GARCIA, R. M. et al. Effect of a denture cleanser on weight, surface roughness, and tensile bond strength of two resilient denture liners. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 89, n. 5, p. 489-494, May. 2003.
107. DAVENPORT, J. C.; WILSON, H. J.; BASKER, R. M. The compatibility of tissue conditioners with denture cleaners and chlorhexidine. **J Dent**, Kidlington, v. 6, n. 3, p. 239-246, Sep. 1978.
108. KULAK-OZKAN, Y.; SERTGOZ, A.; GEDIK, H. Effect of thermocycling on tensile bond strength of six silicone-based, resilient denture liners. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 89, n. 3, p. 303-310, Mar. 2003.
109. ADDY, M.; THAW, M. In vitro studies into the release of chlorhexidine acetate, prednisolone sodium phosphate, and prednisolone alcohol from cold cure denture base acrylic. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v. 16, n. 2, p. 145-157, Mar. 1982.
110. SPIECHOWICZ, E. et al. In vitro study on the inhibiting effect of different agents on the growth of *Candida albicans* on acrylic resin surfaces. **Quintessence Int**, Berlin, v. 21, n. 1, p. 35-40, Jan. 1990.
111. HENNESSEY, T. S. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J Periodontal Res Suppl**, Copenhagen, v. 12, p. 61-67. 1973.
112. WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 11, n. 2, p. 382-402, Apr. 1998.
113. ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 317-321, Nov. 2000.
114. ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: does it matter? **Int J Infect Dis**, Hamilton, v. 6, n. 1, p. S47-53, Mar. 2002.
115. SALTZMAN, W. M. et al. Controlled antibody release from a matrix of poly(ethylene-co-vinyl acetate) fractionated with a supercritical fluid. **J Appl Polym Sci**, v. 48, n. 8, p. 1493-1500. 1993.
116. BRADEN, M. Tissue conditioners. I. Composition and structure. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 49, n. 1, p. 145-148, Jan-Feb. 1970.

117. SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Adv Drug Deliv Rev**, Amsterdam, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, Jun 11. 2001.
118. CASALINUOVO, I. A.; DI FRANCESCO, P.; GARACI, E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 8, p. 69-77. 2004.
119. WINDHOLZ, M. et al. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. Rahway: Merck & Co, Inc., 1983.
120. QUIRYNEN, M. et al. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. **J Clin Periodontol**, Malden, v. 28, n. 12, p. 1127-1136, Dec. 2001.
121. SWEETMAN, S. C. **Martindale: The complete drug reference**: Pharmaceutical Press, 2007. p. 1472-1475.
122. RUSHTON, A. Safety of Hibitane. II. Human experience. **J Clin Periodontol**, v. 4, n. 5, p. 73-79, Dec. 1977.

APÊNDICE A – Preparo de reagentes

Preparo do reagente hidróxido de sódio 3 N

Foram pesados 12 g de hidróxido de sódio e inseridos em um balão volumétrico de 100 mL de fundo chato. Foram adicionados 40 mL de água destilada e a suspensão foi agitada cuidadosamente até sua solubilização. O volume final do balão foi completado com água destilada e aguardou-se o completo resfriamento da solução, que foi armazenada em frasco âmbar de vidro.

Preparo do reagente hidróxido de sódio 1 N

Foram diluídos 10 mL de hidróxido de sódio 3 N em 30 mL de água destilada e a solução foi armazenada em frasco âmbar de vidro.

Preparo do reagente hipoclorito de sódio alcalino

Inicialmente, foram dissolvidos 20 g de hidróxido de sódio em 800 mL de hipoclorito de sódio 2,0 a 2,5% comercial. Foi retirada uma alíquota de 1 mL desta solução e transferida para um frasco erlenmeyer. A esta alíquota, foram adicionados 50 mL de água destilada, 10 mL de ácido acético glacial e 2 g de iodeto de potássio P.A. Foi realizada uma titulação com tiosulfato de sódio 0,1 N. Na bureta, foram adicionados 50 mL de água destilada e 3 mL de amido; a torneira da bureta foi aberta e aguardou-se até o momento em que a solução ficasse incolor. A quantidade de líquido necessária para a titulação, neste caso, foi de 6,5 mL. A partir de cálculos realizados, foi indicado que seriam necessários 608 mL da solução inicial para o preparo da solução de hipoclorito de sódio. Assim, foram adicionados 608 mL de hipoclorito de sódio comercial e 10 g de hidróxido de sódio em um balão volumétrico de 1000 mL. A solução foi protegida da luz e armazenada a 4°C até o momento de sua utilização. Para o preparo do hipoclorito de sódio alcalino, foram utilizados 66 mL da solução padronizada e 33 mL de solução de hidróxido de sódio 3 N.

Preparo do reagente hidróxido de sódio 1 M

Foram pesados 4 g de hidróxido de sódio e dissolvidos em 30 mL de água destilada. Em seguida, o balão volumétrico de 100 mL foi completado com água destilada.

Preparo da solução de p-aminoacetofenona

Foram pesados 0,5 g de p-aminoacetofenona e dissolvidos em 100 mL de metanol em balão volumétrico.