

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

**Efeito da triazina nas propriedades mecânicas e formação de
biofilme em resina acrílica e reembasadores de prótese**

Aline Pinheiro de Moraes

Pelotas, 2011

ALINE PINHEIRO DE MORAES

**EFEITO DA TRIAZINA NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS
E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM RESINA ACRÍLICA E
REEMBASADORES DE PRÓTESE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração Dentística, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci

Co-orientadora: Profa. Dra. Noéli Boscato

Pelotas, 2011

Banca examinadora

Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci

Profa. Dra. Rosemary Sadami Araí Shinkai

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio (suplente)

DEDICATÓRIA

*Ao meu avô Ary,
responsável pela odontologia
na minha vida*

*Aos meus pais,
com todo o amor
que houver nesta vida,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Pelotas** por meio do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Antônio César Gonçalves Borges.

À **Faculdade de Odontologia** através de sua Diretora, Prof^a. Dr^a. Márcia Bueno Pinto.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, em especial ao seu coordenador Prof. Dr. Flávio Demarco, por ser um grande exemplo a todos os alunos, seu entusiasmo é extremamente contagiante.

À minha orientadora **Tatiana** Pereira Cenci, pelo imenso carinho dispensado a mim desde o primeiro momento em que entrei no mestrado e pela incansável paciência durante os momentos em que a “dentista” tinha uma grande dificuldade em entender o mundo da pesquisa e da microbiologia. Obrigada pela confiança, orientação, serenidade, amizade e exemplo de profissional que nunca mediu esforços na colaboração para o desenvolvimento dos meus trabalhos. Muito obrigada pelos valiosos ensinamentos e pela grande oportunidade de conhecer novos horizontes.

À minha co-orientadora **Noéli** Boscato, agradeço de coração por todas as suas sugestões e orientações. Obrigada pela ajuda, apoio, incentivo e palavras de carinho no decorrer deste curso.

Ao Prof. Dr. **Maximiliano** Sérgio Cenci, por sempre instigar novos conhecimentos, contribuindo direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada.

Aos Professores **Flávio** Demarco e **Fernanda** Pappen, pelas colaborações realizadas na qualificação deste trabalho.

A todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia pela convivência e pelo aprendizado.

Ao **Laboratório de Microbiologia** na pessoa do Prof. Dr. Rafael Guerra Lund.

Ao **Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais** (CDC-Bio) na pessoa do Prof. Dr. Evandro Piva.

Ao **Laboratório de Materias Dentários da UFRGS** na pessoa do Prof. Dr. Fabrício Mezzomo Collares, por gentilmente disponibilizar o uso do rugosímetro.

À **Josiane** Silva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), por sua imensa dedicação ao PPGO e a todos os alunos deste programa.

Aos **técnicos dos laboratórios**, que sempre se mostraram solícitos quando precisei.

A todos os **colegas** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, pela agradável convivência e amizade.

À colega de pós-graduação **Françoise** Hélène van de Sande Leite, pela imensa ajuda durante todo o mestrado e amizade. Obrigada!!

Em especial, às amigas **Caroline** e **Thaís** e ao amigo **Rafael**, por representarem a “força-tarefa” imprescindível para a realização desse trabalho, meus braços direito e esquerdo no laboratório, demonstrando mais uma vez que o trabalho em grupo é mais prazeroso e rentável.

A toda a minha **família**, avó, tios, tias e primos agradeço pela torcida, amor e união, pois o carinho e apoio de vocês foram imprescindíveis para esta conquista. Aos meus avós Ana, Ary e Alfeu (*in memoriam*) que nos deixaram antes de ver meu sonho realizado, tenho certeza que continuaram torcendo por mim. Amo todos vocês.

Ao meu **dindo** e colega Régis, teu imenso amor pela odontologia é o meu maior estímulo. É ótimo poder compartilhar o meu dia-a-dia ao teu lado. Obrigada!

A todos os meus amigos e em especial as queridas **amigas**, Anna, Gabriela, Elisa, Marina, Juliana, Tahiana, Isabelle, Eleonora, Roberta e Rosilena pela amizade, pela torcida, pelo entusiasmo com minhas conquistas “Amigo é aquele que aguarda pacientemente e se entusiasma quando vê surgir aquele tão esperado brilho no seu olhar e é quem tem uma palavra sob medida quando estes mesmos olhos estão amplificando tristeza interior”. Amigas, vocês são para sempre. Amo vocês!

Ao **Maia**, grande companheiro, que sempre me incentivou em tudo na minha vida, meu muito obrigada por todo apoio, amizade e carinho. Agradeço ainda pela paciência e grande ajuda em meus momentos de estresse, fazendo com que estes se tornassem bem mais leves.

À minha irmã **Bruna**, pelo apoio, amor, amizade, carinho e preocupação comigo. Te amo muito!

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

*"Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,
portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer
e principalmente viver" !*

Dalai Lama

NOTAS PRELIMINARES

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – estruturas em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (http://www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf).

Resumo

MORAES, Aline Pinheiro. **Efeito da triazina nas propriedades mecânicas e formação de biofilme em resina acrílica e reembasadores de prótese**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A candidíase é a infecção oral fúngica mais comum em usuários de próteses. A associação entre o microrganismo *Candida* e as bases das próteses está diretamente relacionada à eficiência deste microrganismo em aderir e colonizar estas superfícies, sendo esta a etapa inicial essencial para o desenvolvimento da estomatite induzida por prótese. Associado a isto, o uso de reembasadores para próteses tem aumentado, sendo estes materiais mais propensos à adesão microbiana quando comparados a resina acrílica devido a sua maior rugosidade de superfície. Além disso, estes materiais tem demonstrado capacidade de interagir com microrganismos bucais. Este importante problema tem levado a tentativa de desenvolvimento de diversos materiais contendo agentes antifúngicos. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial antifúngico da triazina adicionada à resina acrílica e reembasadores utilizados em prótese dentária, através de um modelo de biofilme de microcosmos, com salivas derivadas de pacientes com ou sem candidíase, verificando sua efetividade em reduzir a adesão microbiana e, consequentemente, diminuir a incidência de infecções por *Candida*. Também avaliaram-se as propriedades mecânicas dos materiais testados após a incorporação da triazina. Foram considerados quatro materiais comercialmente disponíveis (uma resina acrílica ativada por energia de micro-ondas, dois reembasadores resilientes e um reembasador permanente), aos quais foram adicionadas diferentes concentrações de triazina (0; 2,5; 5,0 e 10%). Os resultados indicaram que não houve diferença ($p = 0,059$) entre as concentrações de triazina para a resina acrílica de micro-ondas no teste de resistência à flexão. Em relação a rugosidade de superfície, embora a adição de triazina não tenha levado ao aumento da rugosidade, os reembasadores apresentaram maior rugosidade que a resina acrílica, com o SoftConfort apresentando, em geral, a maior rugosidade ($p < 0,001$). De maneira geral, quando adicionada triazina a 5,0 e 10%, todos os materiais tornaram-se mais solúveis e apresentaram aumento de sorção de água ($p < 0,05$), a exceção do CoeSoft, que não mostrou diferença com a adição do composto químico. Houve diferença entre salivas, sendo que aquela proveniente de indivíduo com candidíase apresentou maiores contagens de microrganismos totais ($p = 0,0294$) e estreptococos totais ($p = 0,0008$). Em relação aos materiais, a contagem de estreptococos, microrganismos totais e espécies de *Candida* foi maior no CoeSoft ($p < 0,0001$). Entretanto, a contagem de espécies de *Candida* foi igual entre os doadores ($p > 0,05$). A adição de triazina não resultou em diminuição de microrganismos totais, estreptococos totais ou espécies de *Candida* em nenhum dos materiais testados ($p > 0,05$). Como conclusão, a adição de triazina a resina acrílica e reembasadores utilizados para confecção de base e reembasamento de próteses em um modelo complexo de biofilme não modificou o desenvolvimento de biofilmes em ambos os pacientes com ou sem candidíase.

Palavras-chave: Candidíase. Resina acrílica. Reembasadores protéticos. Biofilme. Triazina.

Abstract

MORAES, Aline Pinheiro. **Antimicrobial activity of triazine added to denture materials on saliva-derived microcosms: microbiological efficacy and mechanical properties.** 2011. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Candidiasis is the most common fungal infection in denture wearers. The association between *Candida* and denture base is directly related to the efficiency of this micro-organism to adhere and colonize these surfaces, which is an essential initial step for the development of denture-related stomatitis. Additionally, the use of denture liners has increased, with these materials more prone to microbial adhesion when compared with acrylic resin due to its higher surface roughness. These materials have demonstrated capacity to interact with oral micro-organisms. This important problem is the reason why several attempts have been made to develop biomaterials containing antifungal. Thus, the aim of this study was to investigate the potential antifungal activity of triazine added to acrylic resin and liners used in prosthodontics using microcosms biofilm model with saliva derived from patients with or without candidiasis, verifying its effectiveness in reducing microbial adherence and consequently reduce the incidence of *Candida* infections. The mechanical properties of the tested materials after the incorporation of triazine were also evaluated. We considered four commercially available materials (a microwave-cured acrylic resin and two soft denture liners and one hard denture liner) to which were added different concentrations of triazine (0; 2.5; 5.0 and 10%). The results indicated that no difference were found among triazine concentrations in acrylic resin flexural strength ($p= 0.059$). Triazine addition did not result in surface roughness changes, although all denture liners presented higher surface roughness compared with acrylic resin, while in general, SoftConfort presented the highest roughness ($p<0.001$). In general, 5 and 10% triazine addition resulted in more soluble materials. All materials presented increased water sorption with the addition of triazine ($p<0.05$), except for CoeSoft, where no change was observed. Candidiasis patient saliva presented higher counts of total micro-organisms ($p= 0.0294$) and total streptococci ($p = 0.0008$). Regarding materials, total streptococci, total micro-organisms and *Candida* counts were higher in CoeSoft ($p<0.0001$). *Candida* species counts was the same for both saliva donors ($p>0.05$). The addition of triazine did not result in decrease of total micro-organisms, total streptococci or *Candida* species in all materials tested ($p>0.05$). In conclusion, the addition of triazine to acrylic resin and denture liners in a complex biofilm model did not modify the development of biofilms in both patients with and without candidiasis.

Keywords: Candidiasis. Acrylic resin. Denture liners. Biofilm. Triazine.

Lista de Figuras

Projeto

Figura 1 - Ilustração esquemática da matriz de Teflon utilizada para o preparo dos corpos de prova circulares.....27

Figura 2 - Ilustração esquemática da matriz de Teflon utilizada para o preparo dos corpos de prova retangulares.....27

Figura 3 - Ilustração esquemática do ensaio *in vitro* de biofilme de microcosmos...30

Lista de Tabelas

Artigo

Table 1 - Flexural strength values according to substratum type and triazine concentrations in MPa (mean $\pm$ SD).....66

Table 2 - Water sorption and solubility values according to substratum type and triazine concentrations for the tested materials in $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ (mean $\pm$ SD).....66

Table 3 - Surface roughness (Ra – μm) according to substratum type and triazine concentrations (mean $\pm$ SD).....66

Table 4 – Total micro-organisms, total streptococci and *Candida* species counts according to saliva donors, materials and triazine concentrations (mean $\pm$ SE).....67

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Graus Celsius
[]	Concentração
CDC-Bio	Centro de desenvolvimento e controle de biomateriais
DMM	<i>Defined medium enriched with mucin</i> , meio definido enriquecido com mucina
et al.	e outros
FO	Faculdade de Odontologia
G	Grama
H	Hora
S	Segundos
W	Watts
µg/mL	Microgramas por mililitro
µm	Micrometro
Kgf	Quilograma força
mg/mL	Miligramas por mililitro
Min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mol L ⁻¹	Mol por litro ou molar
V	Volume
N	Número de espécimes
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
UFC	Unidades formadoras de colônias
X	Veze

Sumário

Resumo	10
Abstract	11
1 Introdução Geral	16
2 Projeto	19
3 Relatório de campo	45
3.1 Aspectos éticos	45
3.2 Condições gerais	45
3.3 Estudos piloto	45
3.3.1 Piloto.....	45
3.4 Rotinas laboratoriais.....	46
3.4.1 Coleta e processamento de saliva.....	46
3.4.2 Protocolo de obtenção e crescimento dos biofilmes.....	46
3.5 Alterações no projeto original	47
3.5.1 Dificuldades encontradas.....	47
4 Artigo.....	48
5 Conclusões.....	68
Referências.....	69
Apêndices.....	79
Anexo.....	82

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cavidade bucal é colonizada por diversos microrganismos, os quais se apresentam em número limitado, o que é determinado pelas condições que seletivamente os favorecem, em condições de saúde (SAN MILLAN et al., 2000). No entanto, de acordo com a teoria da placa ecológica, sabe-se que a presença e especialmente a proporção de algumas espécies propicia modificações que transformam um estado de saúde em doença, muito mais do que a presença de alguma espécie específica (MARSH, 1994).

A *Candida albicans* está entre os muitos microrganismos que fazem parte da flora comensal da boca, sendo definida como uma levedura, classificada como um fungo diplóide assexuado, com capacidade de multiplicar-se unicelularmente. Ocorre em 30 a 70% dos indivíduos sadios (TEIXEIRA; MEZZARI, 2005), sem que isso acarrete em qualquer problema de saúde. No entanto, em excesso ou em pacientes imunodeprimidos, ocasiona a candidíase (MUZIKA, 2005).

Nos usuários de próteses removíveis, esta inflamação também é denominada de estomatite induzida por prótese ou estomatite por dentaduras, sendo a *Candida albicans* fortemente associada como o principal agente etiológico desta patologia (BARBEAU et al., 2003; WEBB et al., 1998; ZAREMBA et al., 2006). O crescimento desse fungo sobre superfícies é natural no ciclo de vida de *Candida spp.* (KUMAMOTO; VINCES, 2005), o que pode explicar a ocorrência comum da colonização fúngica nos usuários de próteses. As lesões da mucosa bucal relacionadas às próteses removíveis são reações agudas ou crônicas decorrentes da presença de biofilme dental, de leveduras, de constituintes do material utilizado para a confecção das próteses e da pouca retenção ou injúrias mecânicas oriundas do uso de próteses mal adaptadas (BUDTZ-JORGENSEN, 1971; BUDTZ-JORGENSEN, 1978; DOREY et al., 1985).

A etiologia da estomatite induzida por prótese é multifatorial, envolvendo fatores predisponentes locais e sistêmicos (AVON et al., 2007; CANNON; CHAFFIN, 1999; CANNON et al., 1995; HOLMES et al., 1995; IACOPINO; WATHEN, 1992). Segundo Nucci e Marr (2005) (NUCCI; MARR, 2005), nos últimos anos houve um aumento da associação desta patologia a outras doenças mais graves, como carcinomas e HIV, levando ao agravamento de quadros clínicos, uma vez que a candidíase pode interferir com o tratamento e principalmente ser uma barreira para a saúde do paciente (PEREZOUS et al.,

2005), já que as próteses podem servir como fonte de microrganismos para nova infecção (MUZIKA, 2005).

A adesão de microrganismos em superfícies de biomateriais depende da estrutura e composição de sua superfície e das propriedades físico-químicas da superfície das células microbianas (BELLON-FONTAINE et al., 1990; BUSSCHER et al., 1992), as quais vão aderir via formação de um biofilme. Biofilme pode ser definido como uma película não calcificada, fortemente aderida às superfícies dentais, resistindo à presença do fluxo salivar. O termo biofilme é usado para denotar uma comunidade microbiana encapsulada em polímero que se acumula em uma superfície, que também protege contra colonização de patógenos exógenos (WILSON, 2001). O biofilme constitui-se de depósitos bacterianos e constituintes salivares, com um crescimento contínuo, sendo considerada a principal causa das doenças infecciosas e estomatites (ROSAN; LAMONT, 2000).

A formação de biofilmes multi-espécie aumenta a chance de sobrevivência para todos os constituintes do ambiente bucal e é considerado o primeiro passo para a colonização fúngica, levando a um processo infeccioso (CANNON; CHAFFIN, 1999; CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2004). Dessa forma, as espécies de *Candida* podem aderir diretamente ou via uma camada de *placa de dentadura* às bases de próteses (BRANTING et al., 1989; EDGERTON et al., 1993; SAMARANAYAKE et al., 1980). A interface prótese-palato oferece um nicho ecológico único para a colonização de microrganismos tornando-se um meio relativamente anaeróbico e ácido-propício ao desenvolvimento e proliferação de leveduras, acarretando o desenvolvimento de candidíase (AVON; GOULET; DESLAURIERS, 2007; BUDTZ-JORGENSEN, 1974). O biofilme das próteses é composto principalmente por bactérias (CATALAN et al., 1987; KOOPMANS et al., 1988; PEREIRA-CENCI et al., 2008), mostrando alta prevalência de *Streptococcus*, enquanto as leveduras constituem uma pequena parte do total da flora microbiana (BAENA-MONROY et al., 2005; KULAK et al., 1997; PEREIRA-CENCI et al., 2008). Entretanto, o biofilme da estomatite por dentadura é ainda pobremente caracterizado, mas parece oferecer um ambiente propício para interações entre células eucarióticas e procarióticas (CAMPOS et al., 2008; CHANDRA et al., 2001; DOUGLAS, 2003; JENKINSON; DOUGLAS, 2002; KOLENBRANDER, 2000; KUMAMOTO, 2002; RAMAGE et al., 2005). Desta forma, a compreensão da estruturação complexa das comunidades microbianas que compõe o biofilme

saudável e patológico não está completamente elucidada e, através desta, poderíamos desenvolver medidas para evitar a colonização e consequentemente o desenvolvimento da candidíase.

Ainda, pouco se sabe sobre o efeito de diferentes superfícies na interação entre espécies de *Candida* e outros microrganismos, incluindo a superfície de materiais que contêm antifúngicos, como os reembasadores e condicionadores de tecido (PEREIRA-CENCI et al., 2010). A utilização destes materiais é vantajosa em diversas situações clínicas e tem aumentado nos últimos anos. Porém, um dos problemas diretamente relacionados a estes materiais ainda é o acúmulo de biofilme (BOSCATO et al., 2009) e a colonização por *Candida*.

Mesmo com o crescente aprimoramento, esses materiais resilientes apresentam problemas de ordem físico-biológica que comprometem sua utilização clínica por longos períodos de tempo. Segundo Qudah et al (1990) (QUDAH et al., 1990), as limitações são decorrentes do elevado índice de absorção dos fluidos bucais, levando a perda da estabilidade dimensional, a má adaptação da prótese e a descoloração por alguns agentes de limpeza impróprios, tais como o hipoclorito de sódio (NaOCl), que causa a ruptura na adesão entre os materiais (CERVEIRA NETTO; LIN, 1977). A perda de água, plastificante e etanol leva os materiais resilientes ao aumento de sua dureza e consequentemente a uma superfície mais porosa, rugosa e áspera que facilita a contaminação por biofilme e colonização por *Candida albicans* (CRAIG, 2004; NIKAWA et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar dentro de um modelo de biofilme complexo (microcosmos) se a incorporação de triazina a resina acrílica e reembasadores de prótese proporcionaria propriedades antimicrobianas a estes materiais. Para tal, um modelo de biofilme de microcosmos previamente desenvolvido (FILOCHE et al., 2007) foi realizado a partir do inóculo de saliva de pacientes usuários de prótese com e sem candidíase bucal. A triazina foi incorporada em diversas concentrações no momento da manipulação do material no intuito de observar o efeito fungicida deste composto após 96h de formação de biofilme. Também foi realizada avaliação da influência da triazina em algumas propriedades mecânicas dos materiais para base e reembasamento de próteses removíveis também foi realizado.

2 PROJETO

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a epidemiologia das infecções causadas por fungos tem se modificado tendo sido detectado o aumento da incidência e a expansão da população de risco. Isto se deve a diminuição das taxas de mortalidade em alguns países em desenvolvimento e em todos os países desenvolvidos (MCMICHAEL et al., 2004; TULJAPURKAR et al., 2000; WHO, 2003). Consequentemente, a idade da população aumenta e com este aumento, modificam-se as necessidades de assistência odontológica. Neste contexto, as infecções bucais por *Candida* vem recebendo cada vez mais atenção, provavelmente pela alta prevalência mundial (FIGUEIRAL et al., 2007; PEREIRA-CENCI et al., 2008). O reconhecimento de que a candidíase é uma doença importante, principalmente considerando a candidíase relacionada à presença de diferentes espécies de *Candida*, tem levado a inúmeros estudos para clarificar a patogênese da doença. Da mesma forma, o conhecimento sobre as formas de evitar ou diminuir a contaminação por *Candida* na cavidade bucal tornam-se mandatórias.

A candidíase é a infecção bucal fúngica mais comum em usuários de próteses, sendo que esta associação entre *Candida* e próteses está diretamente relacionada à eficiência deste microrganismo em aderir e colonizar estas superfícies (RADFORD et al., 1999), sendo esta uma etapa inicial essencial para o desenvolvimento desta doença. Atualmente, o uso de reembasadores protéticos tem aumentado com a finalidade de melhor distribuição das cargas oclusais e redução de danos locais aos tecidos subjacentes as próteses (MACK, 1989). Os reembasadores podem ser classificados como provisórios ou definitivos de acordo com sua composição, a base de silicone ou resina acrílica, e podem ser química ou termicamente polimerizados (GARCIA et al., 2003; NIKAWA; HAMADA, 1990).

Alguns estudos mostram que estes materiais são mais propensos à adesão microbiana do que a resina acrílica, e isto, provavelmente, deve-se a sua maior porosidade e rugosidade de superfície (NEVZATOGLU et al., 2007; PEREIRA-CENCI et al., 2008). Além disso, eles tem demonstrado capacidade de interagir com microrganismos bucais (NIKAWA et al., 1992; OKITA et al., 1991). Portanto, uma alternativa para impedir as interações desfavoráveis entre os microrganismos e a superfície de biomateriais deve ser considerada.

Neste contexto, alguns pesquisadores tem tentado incorporar agentes antifúngicos ou modificar a superfície destes materiais para diminuir ou tratar uma infecção por *Candida* (BOSCATO et al., 2010; ZHOU et al., 2010). Dentre os compostos utilizados como antimicrobianos, a triazina e seus análogos tem merecido considerável atenção, principalmente devido a sua síntese e utilidade biológica. A estrutura da triazina é um anel heterocíclico, análogo ao anel de seis membros do benzeno, mas com três carbonos substituídos por nitrogênios. Os três isômeros da triazina se distinguem uns dos outros pelas posições destes átomos de nitrogênio, e são referidos como 1,2,3-triazina, 1,2,4-triazina e 1,3,5-triazina. A 1,2,4-triazina é um núcleo importante, encontrada em inúmeros compostos naturais e sintéticos biologicamente ativos (SANGSHETTI; SHINDE, 2010). Estudos tem mostrado que compostos com triazina possuem potentes ações antiprotozoários (BALIANI et al., 2005), anticancerígenos (MENICAGLI et al., 2004), antimaláricos (MELATO et al., 2008), e atividade antiviral (XIONG et al., 2008). Além disso, foi relatado que alguns destes compostos possuem uma potente atividade antimicrobiana (SRINIVAS et al., 2006; ZHOU et al., 2008) e possível atividade antifúngica podendo aumentar a eficácia de outros antifúngicos no tratamento de infecções resistentes (CERNICKA et al., 2007) em modelos de biofilme de uma espécie ou em células planctônicas.

No que concerne às propriedades dos materiais, poucos estudos levam em consideração as diferenças entre os materiais para base e reembasamento de prótese, sejam estes últimos temporários ou permanentes (MILLSAP et al., 1999; RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999; SAMARANAYAKE; MCCOURTIE; MACFARLANE, 1980). Alguns autores relataram problemas relacionados aos materiais utilizados na confecção e no reembasamento de próteses removíveis, sendo o mais freqüente a colonização desses materiais, especialmente dos reembasadores, por várias espécies de *Candida*. Os resultados sugerem que próteses reembasadas com estes materiais são mais passíveis de colonização por fungos, mesmo que estes materiais possuam antifúngicos em sua composição (KULAK; KAZAZOGLU, 1998; PEREIRA-CENCI et al., 2007; WRIGHT et al., 1985), uma vez que os produtos comercialmente disponíveis, possivelmente tem o agente antifúngico removido pela ação da saliva (PEREIRA-CENCI et al., 2007; VERRAN; MARYAN, 1997).

Outro fator a ser considerado é a utilização de concentrações subterapêuticas de antifúngicos baseadas em estudos *in vitro* com células planctônicas. As espécies de *Candida* presentes num biofilme são capazes de aumentar seus fatores de virulência quando tratadas com doses subterapêuticas, o que, por sua vez, aumentam a sua patogenicidade (SEGAL, 2005). Quando os agentes antifúngicos são utilizados, deve ser levada em consideração a formação complexa de biofilmes sobre os substratos. Estudos prévios sugerem que as bactérias presentes dentro de um biofilme oral estariam envolvidas no processo inflamatório causado por estomatite induzida por próteses (BUDTZ-JORGENSEN et al., 1983; CATALAN; HERRERA; MARTINEZ, 1987; GUSBERTI et al., 1985; KOOPMANS; KIPPUW; DE GRAAFF, 1988). Dependendo da necessidade, as bactérias presentes nesse biofilme podem prover aos fungos os compostos necessários que aumentam ou ativam seus determinantes de virulência (WARGO; HOGAN, 2006).

Neste estudo, a triazina será adicionada em diferentes concentrações ao pó da resina acrílica e reembasadores protéticos sendo esperada a diminuição da adesão de espécies de *Candida* e, conseqüentemente, diminuição da incidência de infecções causadas por este fungo. Desta forma, além de ser importante analisar as propriedades mecânicas e estruturais de um novo biomaterial liberador de agente antifúngico, é fundamental analisar sua eficácia frente à formação de biofilmes complexos nos diferentes materiais utilizados para reabilitação oral.

2 QUALIFICAÇÃO DO PRINCIPAL PROBLEMA A SER ABORDADO

Valores insatisfatórios quando do estudo da morfologia microestrutural de um material a base de resina acrílica podem ser influenciados por vários fatores como a presença de poros, avaliada pela rugosidade de superfície do material, liberação de monômero residual, que pode resultar em irritação e conseqüente aparecimento da candidíase, além do aumento das trincas e até mesmo de um grau de desadaptação inaceitável das próteses removíveis, que podem resultar em insucesso da reabilitação protética e comprometimento da saúde dos tecidos da cavidade bucal (BEYLI; VON FRAUNHOFER, 1981; LAI et al., 2004; RAMAGE et al., 2004; SAN MILLAN et al., 2000). Em virtude disso, o estudo das propriedades mecânicas visa complementar o estudo do comportamento das resinas acrílicas e reembasadores frente à adição de um material com atividade antifúngica. Adicionalmente, é necessária a manutenção da atividade antifúngica destes materiais frente ao tempo, sendo este, fator crítico para a durabilidade da atividade antifúngica. Apesar da evolução dos materiais e pesquisas mostrarem que a adição por si só não representa problemas no sentido da possibilidade de incorporação destas partículas aos materiais, avaliações *in vitro* e *in situ* mostram que características mecânicas e estruturais, além da durabilidade do agente antifúngico, ainda são um problema (CENCI, 2008; NIKAWA et al., 1997; PEREIRA-CENCI et al., 2007; VERRAN; MARYAN, 1997). Os principais fatores que explicam essa falta de durabilidade podem ser a instabilidade da ligação dos agentes antifúngicos ao material das resinas acrílicas, que se deterioram ou são rapidamente liberados no meio bucal, a adição em concentração elevada de agentes antifúngicos a expensas de empobrecimento de características mecânicas e a utilização de doses subterapêuticas nos materiais quando avaliados frente à biofilmes formados na cavidade bucal.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo será investigar o potencial antifúngico da triazina, em diferentes concentrações, adicionadas à resina acrílica e reembasadores protéticos utilizados em prótese dentária, utilizando um modelo de biofilme de microcosmos, a fim de verificar sua efetividade em reduzir a adesão microbiana, e avaliar os materiais utilizados quanto à adesão de microrganismos. Adicionalmente, avaliar os materiais utilizados quanto às suas propriedades mecânicas.

4 JUSTIFICATIVA

Boa parte dos reembasamentos de próteses removíveis são realizados utilizando-se materiais temporários (MCCABE, 1998; TARI et al., 2007). Adicionalmente, a alta prevalência de infecções causadas por *Candida* é um problema para a saúde do indivíduo seja pela facilidade de colonização frente a estes materiais, associada à pobre higiene oral de indivíduos usuários de próteses, seja pela dificuldade de diagnóstico ou de tratamento, o que provoca um prejuízo ao paciente (RAMAGE et al., 2004), justificando a adição de um composto com ação antifúngica em biofilmes formados sobre a superfície destes materiais. Considerando que o governo brasileiro investiu somente na saúde bucal entre 2007 e 2010, R\$ 2,7 bilhões o total investido foi mais de vinte vezes superior ao que foi investido no ano de 2002, a otimização de recursos está diretamente relacionada com a durabilidade dos procedimentos realizados.

Desta forma, um material adequado mecanicamente e que apresente potencial antifúngico verdadeiro e duradouro causaria um impacto positivo tanto na saúde dos pacientes quanto no melhor aproveitamento dos recursos públicos e privados. Os resultados poderão ser utilizados para estabelecer o tratamento uma vez que este é dependente do tipo de infecção, o que auxiliaria na elaboração de estratégias futuras de tratamento.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Delineamento Experimental

Este estudo *in vitro* envolverá um delineamento experimental completamente aleatorizado e cego, em que serão convidados 2 voluntários usuários de prótese removível, saudável ou não-saudável (com candidíase). Os pacientes assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido e receberão uma carta de orientação. Os critérios de inclusão serão pacientes de 40 a 70 anos, portadores de próteses removíveis, sendo a prótese superior total e a inferior parcial ou total, com boas condições de saúde geral, não tendo usado antibiótico por pelo menos três meses antes do estudo. Serão excluídos os pacientes não usuários de próteses removíveis, com más condições de higiene, que apresentem outras condições orais que impeçam um diagnóstico micológico imediato, diabetes ou quaisquer outras doenças sistêmicas que predisponham a candidíase, ou sintomas agudos ou crônicos de distúrbios temporomandibulares. O exame inicial dar-se-á através de inspeção direta da mucosa bucal dos indivíduos. Será realizada isoladamente, a coleta de biofilme da mucosa palatal utilizando um swab esterilizado, o material coletado será imediatamente semeado em meio cromogênico (CHROMagar *Candida*) e incubado em aerobiose a 37°C por 48h. Após avaliação dos resultados, indivíduos que não apresentarem nenhuma espécie de *Candida* serão excluídos, uma vez que 1 dos voluntários deverá ter o fungo, mas não a doença e o outro deverá ter estomatite protética. Assim, serão considerados quatro materiais comercialmente disponíveis (uma resina acrílica ativada por energia de micro-ondas, dois reembasadores temporários e um reembasador permanente), aos quais serão adicionadas diferentes concentrações de triazina, material com sabida atividade antifúngica. Estes materiais terão avaliadas suas características mecânicas e estruturais e o efeito antifúngico como fatores em estudo. Espécimes desses materiais serão utilizados como substrato para análise topográfica dos materiais através de microscopia eletrônica de varredura, avaliação da rugosidade de superfície, testes de resistência flexural, testes de sorção e solubilidade e formação de biofilmes utilizando microplacas para cultura de células de 24 poços para avaliar atividade antifúngica. Espécimes sem antifúngicos servirão como controles. Para a formação

do biofilme, serão utilizados inóculos de saliva contendo *Candida* (previamente verificados conforme descrito acima).

5.2 Preparo dos espécimes

Será utilizada uma resina acrílica polimerizada por energia de micro-ondas (Clássico Artigos Odontológicos Ltda, São Paulo, Brazil), um reembasador permanente (Kooliner, GC America, Alsip, IL, USA) e dois reembasadores temporários (CoeSoft, GC America, Alsip, IL, USA e SoftConfort, Dencril Comércio de Plásticos Ltda, São Paulo, Brazil). Inicialmente, serão adicionadas concentrações de 0% - controle, 2,5%, 5,0% e 10% de triazina ao pó dos materiais, sendo todos os materiais manipulados de acordo com as recomendações do fabricante. Para a confecção de espécimes circulares (10mm diâmetro x 2,0mm espessura), será utilizada uma matriz metálica (Figura 1), com exceção dos espécimes de resina acrílica ativada por micro-ondas em que será utilizada uma mufla específica para a polimerização em micro-ondas. Estes espécimes serão confeccionados e utilizados para formação de biofilmes, avaliação de rugosidade de superfície e testes de sorção e solubilidade. Também serão confeccionados espécimes retangulares (65 x 10 x 2,5mm), da mesma maneira que os circulares (Figura 2), e estes serão utilizados para a avaliação de resistência flexural. Após confecção, os espécimes de resina acrílica permanecerão 48h em água destilada deionizada estéril para liberação do monômero residual. Para mimetizar as condições de uso do material reembasador, os espécimes de condicionadores serão fixados sobre bases de resina acrílica. Visando simular a textura de uma base acrílica de prótese total ou prótese parcial removível quando de seu uso clínico (PEREIRA-CENCI et al., 2007), os espécimes de resina acrílica e reembasador permanente receberão acabamento e polimento da forma convencional e os confeccionados com o condicionador tecidual temporário receberão somente acabamento. Estes espécimes serão desinfetados por banho ultrassônico por 30min antes do ensaio de biofilme.

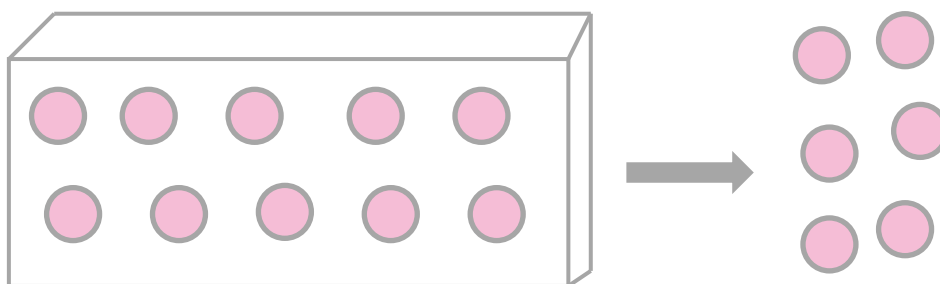


Figura 1. Ilustração esquemática da matriz de Teflon utilizada para o preparo dos corpos de prova circulares

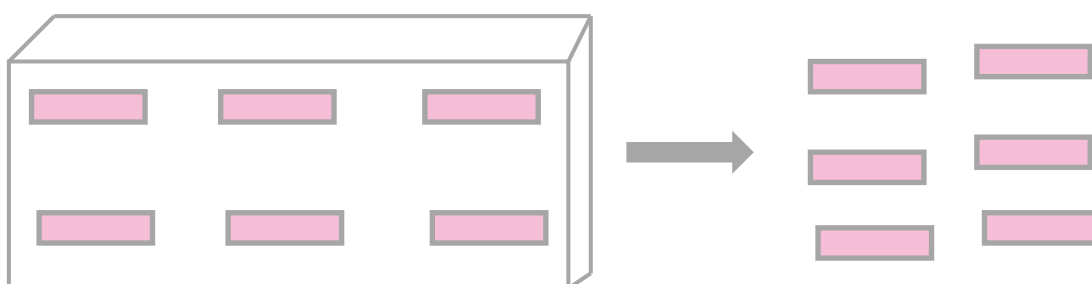


Figura 2. Ilustração esquemática da matriz de Teflon utilizada para o preparo dos corpos de prova retangulares

5.3 Microscopia eletrônica de varredura

Os espécimes serão montados em *stubs* de aço inox e levados a metalizador onde receberão uma camada de 100 angstrom de ouro. Os *stubs* com os espécimes metalizados serão analisados em Microscópio Eletrônico de Varredura quanto à topografia de superfície.

5.4 Rugosidade de superfície

A rugosidade de superfície de cada espécime será mensurada com rugosímetro (Surfcorder SE 1200, KosakaLabs.,Tokyo, Japan) de resolução 0,01 μ m, em temperatura ambiente. De modo a abranger toda superfície de cada espécime, três mensurações serão realizadas em diferentes locais e a média aritmética será o

valor de rugosidade de superfície para o referido espécime (VERRAN; MARYAN, 1997).

5.5 Resistência flexural e resistência ao impacto

O teste de resistência flexural será realizado utilizando uma máquina de ensaios universal (Emic DL500, São José dos Pinhais, PR) através de um teste de carga de 3 pontos com uma célula de carga de 1000kgf e velocidade de 5mm/min. Será aplicada uma força compressiva perpendicular ao centro do espécime, até que haja deflexão e fratura, segundo os parâmetros da ISO 10477 (ISO, 1998). O valor de carga máximo será registrado com seu respectivo gráfico, através do software do equipamento.

5.6 Testes de sorção e solubilidade

Para avaliação da sorção (S_R) e solubilidade (S_L) dos materiais, dez espécimes cilíndricos (15mm diâmetro $\times$ 1mm espessura) de cada material serão obtidos. As dimensões de cada amostra serão mensuradas utilizando paquímetro digital e o volume (V) será calculado. Os espécimes serão então individualmente armazenados a seco a 37°C e repetidamente pesados a cada 24h em balança analítica digital (AUW220D; Shimadzu, Tóquio, Japão), com precisão de 0,01mg, até que uma massa constante (m_1) seja obtida. A seguir, os espécimes serão armazenados em saliva artificial a 37°C. Após sete dias, os espécimes serão removidos da estufa, a água da superfície dos mesmos removida com papel absorvente, e os espécimes pesados novamente para obtenção da m_2 . As amostras retornarão então ao dissecador e os procedimentos de pesagem recomeçarão, até que uma massa constante seja novamente obtida (m_3). A sorção de água (S_R) e a solubilidade (S_L), registradas em mm³, serão calculadas utilizando as fórmulas:

$$S_R = (m_2 - m_3) / V$$

$$S_L = (m_1 - m_3) / V$$

5.7 Formação de biofilme (Figura 3)

Para a formação de biofilme, serão formados biofilmes em placas de micro-poços sobre discos dos materiais descritos acima, tendo como inóculo saliva de 2

voluntários adultos, 1 saudável, mas com a presença de *Candida* a ser verificada através de *screening*, e 1 com candidíase, verificada através de análise clínica e confirmada por análise patológica. Os biofilmes serão crescidos por 4 dias sobre 2 discos para cada saliva/tipo de material (n=6), sendo que 3 experimentos independentes serão realizados para cada combinação tipo de saliva/ tipo de material. Os fatores em estudo serão tipos de saliva, tipos de material e concentrações de triazina. Os biofilmes serão formados independentemente sobre os discos, os quais serão individualizados nos poços das placas (cada placa com 24 poços). O meio de cultura a ser utilizado será o DMM (meio definido enriquecido com mucina) (WONG; SISSONS, 2001), suplementado com 0,15% de sacarose (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). A metodologia adotada para inóculo e crescimento dos biofilmes é a mesma descrita por Filoche et al. (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Inicialmente, $\pm$ 40mL de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, Illinois, EUA) será coletada de cada voluntário, o qual se absterá de higiene bucal por 24h antes da coleta. A saliva obtida será filtrada em lã de vidro estéril e coletada em recipiente estéril, onde será homogeneizada em vortex (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Dessa saliva preparada, 1000 μ L serão inoculados sobre cada disco em cada um dos poços e incubados a 37°C. Após 1h, essa saliva será gentilmente aspirada da base dos poços, e então o meio de cultura (DMM) será adicionado, 1,8mL em cada poço. As placas de micro-poços serão incubadas em anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂). O meio de cultura será substituído diariamente. Após 4 dias, os discos serão removidos dos poços, com pinça estéril, as células não aderidas serão removidas gentilmente por lavagem com solução salina estéril (2mL) (THURNHEER et al., 2003), e então os discos serão colocados em tubo contendo 1mL de salina estéril, e então sonicados (Sonicador UNIQUE, Indaiatuba, SP, Brasil), com potência de 30W, amplitude de 5%, com 3 pulsos de 10s cada, para obtenção do biofilme em suspensão homogênea. Em seguida, as suspensões de biofilme serão diluídas serialmente para contagem de microrganismos totais, estreptococos totais e *Candida* (CENCI, 2008; TENUTA ET AL., 2006). As suspensões serão diluídas em solução salina estéril em séries de até 1:10⁻⁷ e imediatamente inoculadas em duplicata nos seguintes meios de cultura: ágar sangue, para quantificação de microrganismos totais; ágar mitis salivarius, para estreptococos totais e CHROMagar *Candida* para quantificação e diferenciação presuntiva de espécies de *Candida*.

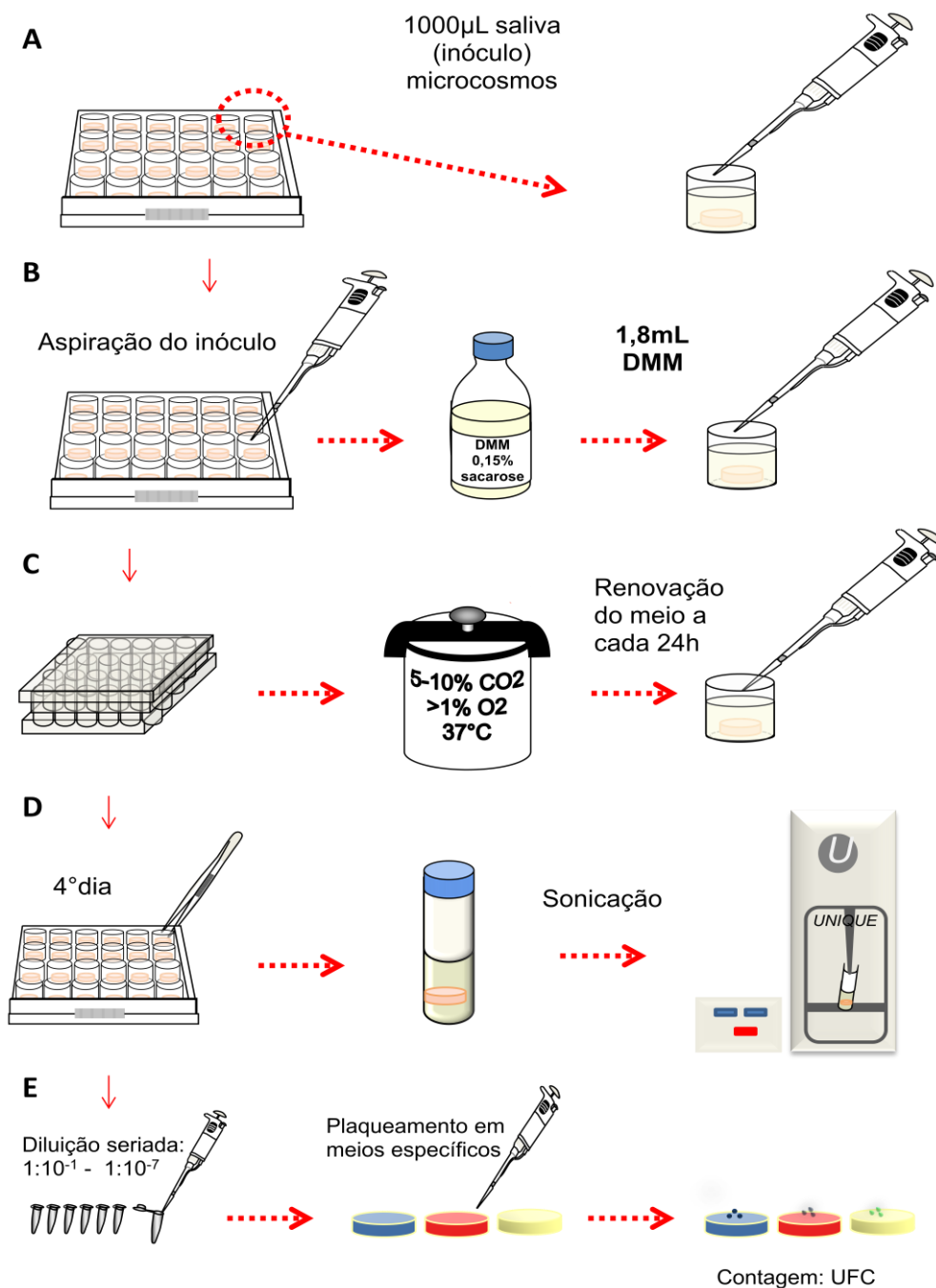


Figura 3. Ilustração esquemática do ensaio *in vitro* de biofilme de microcosmos. A. Inoculação com saliva nos espécimes individualizados nas placas de micro-poços durante 1h, sendo as placas incubadas a 37°C; B. Aspiração do inóculo e adição do meio (DMM + 0,15% sacarose; 1,8mL) C. Incubação das placas em anaerobiose à 37°C e renovação dos meios a cada 24h; D. Sonicação das amostras no 4º dia para homogeneização e realização de análises no biofilme (quantificação através de diluição e plaqueamento em meios específicos). (Modificado de van de Sande, FHL).

CONTAGEM

A semeadura das suspensões do biofilme de microcosmos será feita em CHROMagar *Candida* para contagem das espécies de *Candida*, em ágar sangue para contagem dos microrganismos totais e em ágar mitis salivarius para contagem de estreptococos totais. A contagem das unidades formadoras de colônia será feita através de lupa estereoscópica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção dos resultados, os mesmos serão tabulados e submetidos à análise exploratória dos dados. A escolha do teste estatístico a ser utilizado dependerá da homogeneidade dos resultados. O nível de significância de 5% será utilizado nas análises.

Referências

AVON SL; GOULET JP; DESLAURIERS N. Removable acrylic resin disk as a sampling system for the study of denture biofilms in vivo. **J Prosthet Dent** 2007;97:32-8.

BAENA-MONROY T; MORENO-MALDONADO V; FRANCO-MARTINEZ F; ALDAPE-BARRIOS B; QUINDOS G; SANCHEZ-VARGAS LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2005;10 Suppl 1:E27-39.

BALIANI A; BUENO GJ; STEWART ML; YARDLEY V; BRUN R; BARRETT MP; GILBERT IH. Design and synthesis of a series of melamine-based nitroheterocycles with activity against Trypanosomatid parasites. **J Med Chem** 2005;48:5570-9.

BARBEAU J; SEGUIN J; GOULET JP; DE KONINCK L; AVON SL; LALONDE B; ROMPRE P; DESLAURIERS N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2003;95:51-9.

BELLON-FONTAINE MN; MOZES N; VAN DER MEI HC; SJOLLEMA J; CERF O; ROUXHET PG; BUSSCHER HJ. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. **Cell Biophys** 1990;17:93-106.

BEYLI MS; VON FRAUNHOFER JA. An analysis of causes of fracture of acrylic resin dentures. **J Prosthet Dent** 1981;46:238-41.

BOSCATO N; DELAVI JD; MULLER L; PEREIRA-CENCI T; IMANISHI SW. Influence of varnish application on a tissue conditioner: analysis of biofilm adhesion. **Gerodontology** 2010;27:207-10.

BOSCATO N; RADAVELLI A; FACCIO D; LOGUERCIO AD. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of a soft denture-lining material. **Gerodontology** 2009;26:210-3.

BRANTING C; SUND ML; LINDER LE. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro. **Arch Oral Biol** 1989;34:347-53.

BUDTZ-JORGENSEN E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. **J Am Dent Assoc** 1978;96:474-9.

BUDTZ-JORGENSEN E. Denture stomatitis. IV. An experimental model in monkeys. **Acta Odontol Scand** 1971;29:513-26.

BUDTZ-JORGENSEN E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand J Dent Res** 1974;82:151-90.

BUDTZ-JORGENSEN E; THEILADE E; THEILADE J. Quantitative relationship between yeast and bacteria in denture-induced stomatitis. **Scand J Dent Res** 1983;91:134-42.

BUSSCHER HJ; COWAN MM; VAN DER MEI HC. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. **FEMS Microbiol Rev** 1992;8:199-209.

CAMPOS MS; MARCHINI L; BERNARDES LA; PAULINO LC; NOBREGA FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol** 2008;23:419-24.

CANNON RD; CHAFFIN WL. Oral colonization by *Candida albicans*. **Crit Rev Oral Biol Med** 1999;10:359-83.

CANNON RD; HOLMES AR; MASON AB; MONK BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res** 1995;74:1152-61.

CATALAN A; HERRERA R; MARTINEZ A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: scanning electron microscopic and microbiologic study. **J Prosthet Dent** 1987;57:581-6.

CENCI T. **Avaliação da formação de biofilme de espécies de *Candida* sobre a superfície de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses removíveis**. Tese. Tatiana Pereira Cenci -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.

CERNICKA J; KOZOVSKA Z; HNATOVA M; VALACHOVIC M; HAPALA I; RIEDL Z; HAJOS G; SUBIK J. Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. **Int J Antimicrob Agents** 2007;29:170-8.

CERVEIRA NETTO H; LIN D. Condicionadores teciduais. **Rev Fac Odont São José dos Campos** 1977;6:101-04.

CHANDRA J; KUHN DM; MUKHERJEE PK; HOYER LL; MCCORMICK T; GHANNOUM MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol** 2001;183:5385-94.

CRAIG RG. Inflammation, cardiovascular disease and destructive periodontal diseases. The evolving role of the dental profession. **N Y State Dent J** 2004;70:22-6.

DOREY JL; BLASBERG B; MACENTEE MI; CONKLIN RJ. Oral mucosal disorders in denture wearers. **J Prosthet Dent** 1985;53:210-3.

DOUGLAS LJ. *Candida* biofilms and their role in infection **Trends Microbiol** 2003;11:30-36.

EDGERTON M; SCANNAPIECO FA; REDDY MS; LEVINE MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. **Infect Immun** 1993;61:2644-52.

FIGUEIRAL MH; AZUL A; PINTO E; FONSECA PA; BRANCO FM; SCULLY C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. **J Oral Rehabil** 2007;34:448-55.

FILOCHE SK; SOMA KJ; SISSONS CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiol Immunol** 2007;22:73-9.

GARCIA RM; LEON BT; OLIVEIRA VB; DEL BEL CURY AA. Effect of a denture cleanser on weight, surface roughness, and tensile bond strength of two resilient denture liners. **J Prosthet Dent** 2003;89:489-94.

GUSBERTI FA; GADA TG; LANG NP; GEERING AH. Cultivable microflora of plaque from full denture bases and adjacent palatal mucosa. **J Biol Buccale** 1985;13:227-36.

HOLMES AR; CANNON RD; JENKINSON HF. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J Ind Microbiol** 1995;15:208-13.

IACOPINO AM; WATHEN WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. **J Am Dent Assoc** 1992;123:46-51.

ISO. International Organization for Standardization. Dentistry - polymer-based crown and bridge materials. **No 10477, 1992 and 1, Geneve, Switzerland,**

1998;

JENKINSON HF; DOUGLAS LJ. Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections. In: **Brogden KA, Guthmiller JM, ed. Polymicrobial diseases. ASM Press** 2002;15:357-73.

KOLENBRANDER PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu Rev Microbiol** 2000;54:413-37.

KOOPMANS AS; KIPPUW N; DE GRAAFF J. Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. **J Dent Res** 1988;67:1246-50.

KULAK Y; ARIKAN A; ALBAK S; OKAR I; KAZAZOGLU E. Scanning electron microscopic examination of different cleaners: surface contaminant removal from dentures. **J Oral Rehabil** 1997;24:209-15.

KULAK Y; KAZAZOGLU E. In vivo and in vitro study of fungal presence and growth on three tissue conditioning materials on implant supported complete denture wearers. **J Oral Rehabil** 1998;25:135-8.

KUMAMOTO CA. *Candida* biofilms. **Curr Opin Microbiol** 2002;5:608-11.

KUMAMOTO CA; VINCES MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. **Annu Rev Microbiol** 2005;59:113-33.

LAI CP; TSAI MH; CHEN M; CHANG HS; TAY HH. Morphology and properties of denture acrylic resins cured by microwave energy and conventional water bath. **Dent Mater** 2004;20:133-41.

MACK PJ. Denture soft lining materials: clinical indications. **Aust Dent J** 1989;34:454-8.

MARSH PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res** 1994;8:263-71.

MCCABE JF. A polyvinylsiloxane denture soft lining material. **J Dent** 1998;26:521-6.

MCMICHAEL AJ; MCKEE M; SHKOLNIKOV V; VALKONEN T. Mortality trends and setbacks: global convergence or divergence? **Lancet** 2004;363:1155-9.

MELATO S; PROSPERI D; COGHI P; BASILICO N; MONTI D. A combinatorial approach to 2,4,6-trisubstituted triazines with potent antimalarial activity: combining conventional synthesis and microwave-assistance. **ChemMedChem** 2008;3:873-6.

MENICAGLI R; SAMARITANI S; SIGNORE G; VAGLINI F; DALLA VIA L. In vitro cytotoxic activities of 2-alkyl-4,6-diheteroalkyl-1,3,5-triazines: new molecules in anticancer research. **J Med Chem** 2004;47:4649-52.

MILLSAP KW; BOS R; VAN DER MEI HC; BUSSCHER HJ. Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. **Antonie Van Leeuwenhoek** 1999;75:351-9.

MUZIKA BC. Oral fungal infections **Dent Clin North Am** 2005;49:49-65.

NEVZATOGLU EU; OZCAN M; KULAK-OZKAN Y; KADIR T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. **Clin Oral Investig** 2007;11:231-6.

NIKAWA H; HAMADA T. Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans* in vitro. **Arch Oral Biol** 1990;35:571-3.

NIKAWA H; IWANAGA H; KAMEDA M; HAMADA T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. **J Prosthet Dent** 1992;68:804-8.

NIKAWA H; JIN C; MAKIHIRA S; EGUSA H; HAMADA T; KUMAGAI H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. **J Oral Rehabil** 2003;30:243-50.

NIKAWA H; YAMAMOTO T; HAMADA T; RAHARDJO MB; MURATA H; NAKANODA S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. **J Oral Rehabil** 1997;24:350-7.

NUCCI M; MARR KA. Emerging fungal diseases. **Clin Infect Dis** 2005;41:521-6.

OKITA N; ORSTAVIK D; ORSTAVIK J; OSTBY K. In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. **Dent Mater** 1991;7:155-60.

PEREIRA-CENCI T; CURY AA; CENCI MS; RODRIGUES-GARCIA RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. **Int J Prosthodont** 2007;20:308-10.

PEREIRA-CENCI T; DA SILVA WJ; CENCI MS; CURY AA. Temporal changes of denture plaque microbiologic composition evaluated in situ. **Int J Prosthodont** 2010;23:239-42.

PEREIRA-CENCI T; DEL BEL CURY AA; CRIELAARD W; TEN CATE JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. **J Appl Oral Sci** 2008;16:86-94.

PEREIRA-CENCI T; DENG DM; KRANEVELD EA; MANDERS EM; DEL BEL CURY AA; TEN CATE JM; CRIELAARD W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. **Arch Oral Biol** 2008;53:755-64.

PEREZOUS LF; FLAITZ CM; GOLDSCHMIDT ME; ENGELMEIER RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. **J Prosthet Dent** 2005;93:288-93.

QUDAH S; HARRISON A; HUGGETT R. Soft lining materials in prosthetic dentistry: a review. **Int J Prosthodont** 1990;3:477-83.

RADFORD DR; CHALLACOMBE SJ; WALTER JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. **Crit Rev Oral Biol Med** 1999;10:99-116.

RAMAGE G; SAVILLE SP; THOMAS DP; LOPEZ-RIBOT JL. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot Cell** 2005;4:633-8.

RAMAGE G; TOMSETT K; WICKES BL; LOPEZ-RIBOT JL; REDDING SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2004;98:53-9.

ROSAN B; LAMONT RJ. Dental plaque formation. **Microbes Infect** 2000;2:1599-607.

SAMARANAYAKE LP; MCCOURTIE J; MACFARLANE TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. **Arch Oral Biol** 1980;25:611-5.

SAN MILLAN R; ELGUEZABAL N; REGULEZ P; MORAGUES MD; QUINDOS G; PONTON J. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. **Microbiology** 2000;146 (Pt 9):2105-12.

SANGSHETTI JN; SHINDE DB. One pot synthesis and SAR of some novel 3-substituted 5,6-diphenyl-1,2,4-triazines as antifungal agents. **Bioorg Med Chem Lett** 2010;20:742-5.

SEGAL E. *Candida*, still number one--what do we know and where are we going from there? **Mycoses** 2005;48 Suppl 1:3-11.

SRINIVAS K; SRINIVAS U; BHANUPRAKASH K; HARAKISHORE K; MURTHY US; RAO VJ. Synthesis and antibacterial activity of various substituted s-triazines. **Eur J Med Chem** 2006;41:1240-6.

TARI BF; NALBANT D; DOGRUMAN AL F; KUSTIMUR S. Surface roughness and adherence of *Candida albicans* on soft lining materials as influenced by accelerated aging. **J Contemp Dent Pract** 2007;8:18-25.

TEIXEIRA ML; MEZZARI A. Prevalência de *Candida albicans* e não-*albicans* em próteses dentárias **NewsLab** 2005;Ed 70:

TENUTA LM; RICOMINI FILHO AP; DEL BEL CURY AA; CURY JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. **Caries Res** 2006;40:546-9.

THURNHEER T; GMUR R; SHAPIRO S; GUGGENHEIM B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. **Appl Environ Microbiol** 2003;69:1702-9.

TULJAPURKAR S; LI N; BOE C. A universal pattern of mortality decline in the G7 countries. **Nature** 2000;405:789-92.

VERRAN J; MARYAN CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. **J Prosthet Dent** 1997;77:535-9.

WARGO MJ; HOGAN DA. Fungal--bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. **Curr Opin Microbiol** 2006;9:359-64.

WEBB BC; THOMAS CJ; WILLCOX MD; HARTY DW; KNOX KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Aust Dent J** 1998;43:45-50.

WHO. The world health report. reducing risks, promoting healthy life. **Geneva: World Health Organization**

2003;186–94.

WILSON M. Bacterial biofilms and human disease. **Sci Prog** 2001;84:235-54.

WONG L; SISSONS C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Arch Oral Biol** 2001;46:477-86.

WRIGHT PS; CLARK P; HARDIE JM. The prevalence and significance of yeasts in persons wearing complete dentures with soft-lining materials. **J Dent Res** 1985;64:122-5.

XIONG YZ; CHEN FE; BALZARINI J; DE CLERCQ E; PANNECOUQUE C. Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 11: structural modulations of diaryltriazines with potent anti-HIV activity. **Eur J Med Chem** 2008;43:1230-6.

ZAREMBA ML; DANILUK T; ROZKIEWICZ D; CYLWIK-ROKICKA D; KIERKLO A; TOKAJUK G; DABROWSKA E; PAWINSKA M; KLIMIUK A; STOKOWSKA W; ABDELRAZEK S. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. **Adv Med Sci** 2006;51 Suppl 1:233-6.

ZHOU C; MIN J; LIU Z; YOUNG A; DESHAZER H; GAO T; CHANG YT; KALLENBACH NR. Synthesis and biological evaluation of novel 1,3,5-triazine derivatives as antimicrobial agents. **Bioorg Med Chem Lett** 2008;18:1308-11.

ZHOU L; TONG Z; WU G; FENG Z; BAI S; DONG Y; NI L; ZHAO Y. Parylene coating hinders *Candida albicans* adhesion to silicone elastomers and denture bases resin. **Arch Oral Biol** 2010;55:401-9.

ORÇAMENTO

Os materiais e equipamentos a serem utilizados neste trabalho estão detalhados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Materiais

Produto	Fabricante
Meio de Cultura CHROMagar <i>Candida</i>	MERCK
Meio de cultura Blood Agar base	MERCK
Meio de Cultura Ágar Mitis Salivarius	DIFCO
Pipetas graduadas descartáveis	
Eppendorfs	Axygen
CoeSoft	GC America
Kooliner	GC America
SoftConfort	Dentispaly
Resina acrílica para micro-ondas	Clássico
Reagentes para confecção de DMM, saliva artificial	
Anaerobac c/ 10	Probac
Placa p/ cultura de tecidos fundo chato c/ tampa estéril 24 poços	TPP
Placa de petri descartável 90 x 15mm c/ 10	J.Prolab
Swab	
Mufla para acrilização em micro-ondas	DEFAMA
Filtro Millex GV 0,22µm 25mm c/ 25	Millipore JBR610021
Pipetas graduadas descartáveis	
Ponteira cor amarela 20 a 200µl pct. c/ 1000	Axygen T200Y
Ponteira cor natural 20 a 300µl pct. c/ 1000	Axygen T350-C
Ponteira cor azul 100 a 1000µl pct. c/ 1000	Axygen T1000-B
Rack c/ 96 ponteiros 0,5 a 10µl	Axygen
Rack c/ 96 ponteiros 20 a 200µl	Axygen
Rack c/ 96 ponteiros 20 a 300µl	Axygen
Rack c/ 96 ponteiros 100 a 1000µl	Axygen
Valor total em reais	R\$ 12.000,00

Tabela 2: Equipamentos*

<i>Equipamento</i>	<i>Fabricante</i>
Mufla Metálica	Dental Kaminski
Vibrador para Gesso	Dental Kaminski
Agitador magnético c/ aquecimento	mod. 752A

*Os equipamentos encontram-se disponíveis na
Faculdade de Odontologia.

Fontes de financiamento

Auxílio Recém-Doutor – ARD FAPERGS (R\$ 6.912,00); recursos dos pesquisadores

3 Relatório de Campo

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPeL/ RS) sob parecer nº. 099/2009. Os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, a fim de autorizar sua participação no estudo (Apêndices).

3.2 Condições gerais

O modelo de biofilme *in vitro* descrito por Filoche *et al.* (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007) foi utilizado com modificações. O estudo foi completamente cego e aleatorizado. Os biofilmes foram formados independentemente em placas de 24 micro-poços (TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, SU) sobre discos de resina acrílica de micro-ondas e reembasadores protéticos, tendo como inóculo saliva humana de 2 voluntários para obtenção de microcosmos. Foi utilizado um meio de crescimento análogo à saliva - meio definido enriquecido com mucina (DMM) (WONG; SISSONS, 2001). A confecção do meio de cultura foi realizada com componentes da marca Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, Montana, EUA), exceto pelos sais (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ).

3.3 Estudos Piloto

3.3.1 Piloto

Foram confeccionados 4 espécimes de cada material para realização do piloto. Os biofilmes foram crescidos por 4 dias, em duplicatas para cada condição avaliada, saliva/tipo de material. Um meio definido enriquecido com mucina (DMM) foi empregado (WONG; SISSONS, 2001), suplementado com 0,15% de sacarose (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Foram utilizados 1,8mL do meio de cultura e este foi substituído diariamente. As placas de micro-poços foram incubadas em anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂) e no 3º dia, observou-se a contaminação do meio DMM, provavelmente por fungos, sendo necessário descartá-lo e realizar um novo piloto. Neste, da mesma forma que no anterior, os biofilmes foram

crescidos independentemente por 4 dias em duplicatas, sendo que no total 68 biofilmes foram formados, sendo 4 destes controles de contaminação do meio de cultura. Foi realizada análise da composição microbiológica do biofilme (diluição e plaqueamento), seguido de contagem (CFU).

3.4 Rotinas laboratoriais

3.4.1 Coleta e processamento da saliva

Foi realizada a coleta de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, Illinois, EUA) de dois voluntários adultos, sendo um saudável (J.C.S.) e outro com candidíase (A.A.P.), que não haviam estado sob terapia antibiótica nos 3 meses que antecederam o experimento e conforme critérios de inclusão e exclusão previamente descritos no projeto. Os doadores suspenderam a higiene oral por 24h previamente às coletas, que foram realizadas no período matutino (em jejum). A saliva era depositada em um coletor graduado estéril e transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia (FO-UFPel). A saliva de cada voluntário foi homogeneizada em vortex e imediatamente utilizada como inóculo. Para cada experimento, as coletas de saliva foram realizadas no momento de sua utilização.

3.4.2 Protocolo de obtenção e crescimento dos biofilmes

A saliva foi inoculada sobre os espécimes de resina acrílica de micro-ondas e reembasadores protéticos em placas de micro-poços (24 poços), em um volume de 1000µL por poço. Após 1h em repouso, a saliva foi delicadamente aspirada da base dos poços, e 1,8mL de saliva artificial - meio DMM (com 0,15% de sacarose) - foi adicionado em cada micro-poço e, então as placas foram incubadas em condição atmosférica de anaerobiose (5-10% CO₂ e menos que 1% O₂) em jarras (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda., Santa Cecília, SP) com geradores de anaerobiose (Anaerobac - Probac) sob temperatura controlada (37°C). O meio (DMM) foi renovado diariamente. Após os 4 dias, os espécimes foram removidos dos poços com pinça estéril, e os microrganismos não aderidos foram removidos gentilmente por lavagem com solução salina estéril (2mL) (THURNHEER et al., 2003) , os discos foram colocados em tubo contendo 1mL de salina estéril, e então

sonicados (Sonicador UNIQUE, Indaiatuba, SP, Brasil) com potência de 30W, amplitude de 5%, com 3 pulsos de 10s cada, para obtenção do biofilme em suspensão homogênea. Em seguida, as suspensões de biofilme foram diluídas serialmente para contagem de microrganismos totais, estreptococos totais e espécies de *Candida* (CENCI, 2008; TENUTA et al., 2006). As suspensões foram diluídas em solução salina estéril em séries de até $1:10^{-7}$ e imediatamente inoculadas em duplicata nos seguintes meios de cultura: ágar sangue, para quantificação de microrganismos totais; ágar mitissalivarius, para estreptococos totais e CHROMagar *Candida* para quantificação e diferenciação presuntiva de espécies de *Candida*.

3.5 Alterações no projeto original

3.5.1 Dificuldades encontradas

Em virtude do tempo despendido na adequação do Laboratório de Microbiologia e obtenção e/ou utilização de equipamentos necessários à pesquisa no projeto inicialmente proposto, o cronograma previsto para início dos experimentos foi alterado. Desta forma, a avaliação da topografia de superfície através da microscopia eletrônica de varredura foi descartada e a análise da rugosidade de superfície dos materiais testados foi realizada com atraso.

ARTIGO

Título: Triazine added to denture materials on saliva-derived microcosms: microbiological efficacy and physico-mechanical properties[§]

Aline Pinheiro de Moraes, Caroline Konzgen Barwaldt, Thaís Zorzoli Nunes, Rafael Sarkis Onofre, Fabrício Aulo Ogliari, Noéli Boscato, Tatiana Pereira-Cenci

Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Brazil

Corresponding author: Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas, RS, Brazil. 96015-560.
Tel./Fax: +55-53-3222-6690.

E-mail: tatiana.cenci@ufpel.tche.br

§ Artigo formatado segundo as normas do periódico Archives of Oral Biology

Abstract

Objective: The aim of this study was to assess the effect of triazine incorporation on acrylic resin and denture liners physico-mechanical properties and on biofilm formation of saliva derived microcosms of patients with or without candidiasis.

Design: Biofilms were formed on microwave-cured acrylic resin (Onda-Cryl[®]), one hard denture liner (Kooliner[®]) and two soft denture liners (CoeSoft[®] and SoftConfort[®]) containing 0, 2.5, 5 and 10% triazine. Effects were assessed by water sorption and solubility, flexural strength and surface roughness of the specimens and colony-forming unit (CFU) counts of the biofilms.

Results: Flexural strength and surface roughness of the materials remained the same after the addition of triazine ($p > 0.05$), although all denture liners presented higher surface roughness compared with acrylic resin, with SoftConfort in general presenting the highest roughness ($p < 0.001$). In general, the addition of 5 and 10% triazine led to more soluble materials, with the greatest water sorption in SoftConfort ($p < 0.001$), while in acrylic resin and hard denture liner there was decreased water sorption ($p < 0.001$ and $p < 0.014$, respectively). Saliva donor with candidiasis resulted in higher counts of total micro-organisms ($p = 0.0294$) and streptococci ($p = 0.0008$). Soft denture liners showed the highest counts for total micro-organisms and streptococci ($p < 0.001$). Higher *Candida* counts were recovered from CoeSoft from patients with and without candidiasis.

Conclusion: Mechanical tests showed that the addition of triazine in concentrations higher than 2.5% result in materials with inferior mechanical properties. The addition of triazine added directly to denture materials was not beneficial in reducing the adhesion of *Candida* in a complex biofilm model.

Keywords: candidiasis, acrylic resin, denture liners, biofilm, triazine

1. Introduction

Candida albicans is accepted as the main pathogen responsible for the development of denture stomatitis, which is one of the most common infections in the oral environment.^{1,2} Poorly fitting dentures and continuous denture wearing, the use of denture liners and poor oral hygiene facilitate denture plaque formation and therefore are the most frequent local causes of this opportunistic infection.^{1,2} In this context, it is particularly important to consider the factors governing *Candida* biofilm formation, especially in relation to substratum, interactions with other micro-organisms and host characteristics. Hence, it is clear that data on the role of these features related to the onset of the disease are still needed.

On a given surface, the formation of multi-species biofilms improves the chances of survival for all the constituents in the oral environment and may be the first step for fungi colonisation leading to an infectious process.³⁻⁵ As a result, *Candida* species may adhere directly or via a layer of denture plaque to the denture base materials.^{6,7} Nevertheless, little is known on the effect of different surfaces on the interactions among *Candida* species and other oral micro-organisms, including surfaces containing antimicrobials, such as several soft and hard denture liners. The use of denture liners is advantageous in many clinical situations and has increased in recent years. However, one of the problems directly associated to these materials is still the biofilm accumulation and *Candida* colonization.

Despite extensive investigations on bacterial biofilms, the development of complex biofilms, and various factors affecting this process remain to be determined. Only limited attention has been paid to the important interactions between yeasts, substratum surfaces, oral bacteria and the differences between healthy and diseased

patients.^{8,9} Therefore, reproducing *in vivo*-like biofilm models is essential to understanding the nature of *Candida* biofilms and performing studies of biofilm formation and antifungal drug resistance.⁴

In this context, considerable attention has been given to triazines and their analogues due to their broad biological utility and their synthesis, being found in natural and synthetic compounds.¹⁰ The triazine structure is a heterocyclic ring, analogous to the six-membered benzene ring but with three carbons replaced by nitrogens. The three isomers of triazine are distinguished from each other by the positions of their nitrogen atoms, and are referred to as 1,2,3-triazine, 1,2,4-triazine, and 1,3,5-triazine. Some studies have shown that the triazine compounds possess potent antiviral activity,¹¹ antiprotozoal,¹² anticancer,¹³ and antimalarial,¹⁴ while some of these compounds possess potent antimicrobial activity¹⁵ and antifungal activity which could increase the effectiveness of other antifungal agents.¹⁶

Thus, the aim of this study was to investigate whether the addition of triazine to acrylic resin and denture liners can effectively reduce microbial adhesion and thus decrease *Candida* counts using an *in vivo*-like biofilm model (microcosms). In addition, we tested several mechanical properties of these materials in order to confirm if triazine addition would not modify these materials characteristics and mechanical properties.

2. Materials and Methods

Experimental Design

This *in vitro* study had a completely randomized and blinded design with substratum type (acrylic resin or denture liners), triazine concentration (0, 2.5, 5 or 10%), and saliva (healthy or diseased – with candidiasis) as factors. The study was

approved by the Local Research and Ethics Committee (Protocol 099/2009). The oral health of the patients was assessed, and all participants signed written informed consent before being accepted into the study. Inclusion criteria included: adults (40-70 years old), of both genders, with removable dentures (complete upper denture and lower removable partial denture), normal salivary flow rate (0.3 – 0.5 mL/min), good general and oral health, ability to comply with the experimental protocol, not having used antibiotics during the 3 months prior to the study, and not using any other type of intraoral device. The exclusion criteria eliminated patients not wearing dentures, with poor hygiene conditions, diabetes or other systemic conditions that predispose to candidiasis, or acute or chronic symptoms of temporomandibular disorders. Two patients wearing removable dentures, one patient identified as *Candida* carrier but healthy and the other with candidiasis were selected to participate of this study. We used four commercially available materials, a microwave-cured acrylic resin (Clássico Artigos Odontológicos Ltd., São Paulo, Brazil) and three denture liners (Kooliner and CoeSoft, GC America, Alsip, IL, USA; SoftConfort, Dencril Comércio de Plásticos Ltd, São Paulo, Brazil) to add different concentrations of triazine, (1,3,5-Triacryloylhexahydro - 1,3,5-triazine 98%) (SIGMA-ALDRICH). Surface roughness, flexural strength and water sorption and solubility were evaluated to assess mechanical properties of the experimental materials (with triazine). Discs of the materials were used as substrata, using 24-well polystyrene tissue culture plates. Discs without saliva inoculums served as controls. Saliva-derived biofilms were formed for 96 hours. After this period, discs with biofilms were removed from the wells and CFU counts of total micro-organisms, total streptococci and *Candida* species were calculated.

Preparation of specimens

Soft and hard denture liners (soft: CoeSoft and SoftConfort; hard: Kooliner) and microwave-cured acrylic resin discs were prepared according to the manufacturers specifications at room temperature ($20 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ and $50 \pm 5\%$ relative humidity), under aseptic conditions, using a Teflon mould (10.6mm in diameter and 1.5-2.0mm in thickness). A uniform surface was ensured by placing glass slides on both sides of the mould and firmly fixing both ends, and separating the glass slides after curing, after preparation.⁹ To mimic the conditions of use of relining, specimens of denture liners were fixed on acrylic resin bases. After preparation, the specimens of acrylic resin remained 48h in distilled deionized water to release the residual monomer. Aiming to simulate the texture of the internal surface of a denture,⁹ acrylic resin and Kooliner specimens were ground using progressively smoother aluminium oxide papers (320-, 400-, and 600-grit) in a horizontal polisher. Discs were used immediately. Ten discs were made for each of the mechanical tests (water sorption and solubility, flexural strength and surface roughness). Experimental materials were made in the same way, except that different concentrations of triazine were added directly to the powder of these materials (2.5, 5 and 10% in weight). Rectangular specimens (65 x 10 x 2.5mm) of acrylic resin were made for flexural strength test.

Flexural strength test

Flexural strength of acrylic resin (n=10) was determined using a three-point bending testing device (Universal Testing Machine Emic DL500, São José dos Pinhais, Brazil) with a crosshead speed of 5mm/min and 1000Kgf load cell. The flexural testing device consisted of a central loading plunger and 2 polished cylindrical supports. The distance between the centers of the supports was 4mm. The compressive force was applied perpendicular to the center of the specimens

until a deviation of the load-deflection curve and the fracture of specimen occurred yielding flexural strength (MPa).

Sorption and solubility tests

Disc-shaped specimens ($n = 10$), 15mm in diameter (D) and 2mm in height (h) were prepared for each material. All specimens were stored in a desiccator at 37°C with silica gel, and were weighed daily to verify mass stabilization (dry mass, m_1), which was represented by mass variations lower than 0.1mg in any 24h interval. Three specimens were stored in artificial saliva at 37°C for 7 days to obtain the mass after saturation with saliva (m_2). The specimens were then placed in the desiccators again, at 37°C, and reweighed again until a constant dry mass (m_3) was obtained. Weighing was performed using an analytical balance with 0.01mg accuracy (AUW220D, Shimadzu, Tokyo, Japan). The volume (V) of each specimen was calculated based on the following equation: $V = \pi R^2 h$, where R is the specimen radius. Water sorption (WS) and solubility (SL), given in $\mu\text{g}/\text{mm}^{-3}$, were calculated as follows: $WS = (m_2 - m_3)/V$; $SL = (m_1 - m_3)/V$.

Surface roughness

Surface roughness (R_a) of the specimens was measured using a profilometer (SJ 201; Mitutoyo, Tokyo, Japan) with a 0.01-mm resolution, calibrated with a cut-off value of 0.8mm, 2.4mm of transverse length, and 0.5mm/s. Three readings were made for each specimen, and a mean value was calculated.^{9,17}

Biofilm assays

Microcosm biofilms were initiated from stimulated human saliva of two healthy and non-healthy (with candidiasis) donors who refrained from oral hygiene 24h prior to saliva collection.¹⁸ Saliva collected were immediately used. Acrylic resin and

denture liner previously prepared discs were transferred aseptically into sterile wells (24-well tissue culture plates; Bio-one, Greiner, Frickenhausen, Germany) and 1000µL of fresh (homogenised) saliva was dispensed into each disc. After one hour at room temperature, the saliva was aspirated, growth medium (1.8 mL) was added and plates incubated in anaerobiosis. The microcosm biofilm model described by Filoche et al. 2007¹⁸ was used.

The nutrient growth medium used for the experiments was a saliva analogue, defined medium enriched with mucin (DMM). Standard growth medium used in this experiment had a pH of 6.8 and contained pig gastric mucin (2.5 g/l), urea (1.0 mmol/l), salts (in mmol/l: CaCl₂, 1.0; MgCl₂, 0.2; KH₂PO₄, 3.5; K₂HPO₄, 1.5; NaCl 10.0; KCl 15.0; NH₄Cl 2.0), a basal mixture of amino acids based on salivary levels of 21 free amino acids, 17 vitamins and growth factors and 'protein/peptide' equivalent amino acids to model the proteins in saliva, constructed to be equivalent to 5.0g/l casein.¹⁹ The concentrations of the 'protein/peptide' equivalent amino acids were (in mmol/l): alanine 1.95, arginine 1.30, asparagine 1.73, aspartic acid 1.52, cysteine 0.05, glutamic acid 5.41, glutamine 3.03, glycine 1.95, histidine 1.08, isoleucine 2.38, leucine 3.68, lysine 3.03, methionine 1.08, phenylalanine 1.73, proline 3.68, serine 3.46, threonine 1.08, tryptophan 0.43, tyrosine 2.17, valine 2.38 with 0,15% sucrose.²⁰

The growth medium was replaced daily. Preceding replacements, plates were gently shaken and discs were transferred to a new plate where new artificial saliva medium was added. At the end of 4 days of biofilm accumulation, discs were aseptically removed from the wells and washed by gentle insertion in a new well containing 2 ml of sterilized saline solution for 2s to remove loosely adherent micro-organisms. Discs were subsequently processed and sonicated at 30w with 3 pulses

of 10 seconds in phosphate buffer saline (PSB). The suspensions were subsequently serially diluted in PBS and 20µl samples were plated in duplicate on blood agar, mitis salivarius agar and CHROMagar™ *Candida*. Plates were incubated at 37°C, under anaerobic (blood agar and mitis salivarius agar) or aerobic (CHROMagar™ *Candida*) conditions for 24–96h. Colony-forming units (CFU) were calculated using a stereomicroscope, and the results were expressed in colony forming units per area (disc surface area: $2.7 \pm 0.2\text{cm}^2$).

For every experiment the saliva was collected at the same time of day and the volume limited to 50ml per collection period, such as to account for the circadian rhythm in saliva composition.²¹ All biofilm assays were performed in duplicate in at least three independent experiments on different days. Discs with DMM but without saliva inoculums were also incubated to rule out possible contamination.

Statistical analysis

Statistical analyses were done using SAS software (SAS Institute Inc., version 9.0, Cary, N.C., USA) employing a significance level fixed at 5%. The null hypothesis assumed no differences among saliva donor, material, and triazine concentration. Data that violated the assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were transformed. Data of water sorption and solubility and flexural strength were analyzed by one-way ANOVA and data of surface roughness by two-way ANOVA, followed by all pairwise comparisons (Tukey's method). For microbiological analyses, total streptococci, total micro-organisms and *Candida* species were analyzed by three-way ANOVA followed by Tukey test.

3. Results

Table 1 shows mean and standard deviation for flexural strength. One-way ANOVA did not show a statistically significant difference ($p=0.059$) in flexural strength values for microwave-cured acrylic resin considering triazine concentrations. Table 2 presents the results for water sorption and solubility. In general, water solubility test indicated that the addition of 5 and 10% triazine made materials more soluble ($p<0.001$). For water sorption tests, the addition of triazine resulted in varying results. CoeSoft did not show differences in water sorption ($p>0.05$) with the addition of triazine. However, the addition of triazine in SoftConfort resulted in more water sorption ($p<0.001$), whilst in acrylic resin and Kooliner, there was decreased water sorption ($p<0.001$ and $p<0.014$, respectively). Table 3 shows the results for surface roughness (R_a). Triazine addition did not result in surface roughness changes in materials, although all denture liners presented higher surface roughness compared with acrylic resin, with SoftConfort presenting the highest surface roughness in general ($p<0.001$).

Table 4 shows the microbiological results (CFU counts. mm^{-2}) for total micro-organisms, total streptococci and *Candida* species recovered from biofilm considering saliva donors, triazine concentrations and materials tested. There were statistical differences in total streptococci counts considering the different donors, where higher counts could be observed in the saliva with candidiasis ($p=0.0008$). Additionally, CoeSoft showed the highest numbers of total streptococci ($p=0.009$). No statistical difference was found among triazine concentrations for total streptococci ($p>0.05$). The same trend occurred for total micro-organisms, where saliva of candidiasis donor showed higher counts of total micro-organisms ($p=0.0294$), whilst CoeSoft was the material showing the highest counts of total micro-organisms

($p=0.0005$). Again, triazine addition did not result in decreased counts of total micro-organisms ($p>0.05$). For *Candida* species, both donors presented the same counts of *Candida* ($p>0.05$), and the only difference occurred for materials tested, with CoeSoft showing higher counts of *Candida* ($p<0.0001$).

4. Discussion

Our study aimed to add triazine in different concentrations, to acrylic resin and denture liners, using a microcosms biofilm model, being expected to decrease adhesion of *Candida*. We used microcosm biofilms derived from human saliva in order to simulate the human oral cavity. To the authors' knowledge this is the first study to use saliva derived from healthy and diseased (with candidiasis) individuals to test the effect of an antifungal added directly to materials used in prosthodontics. We have used microcosms biofilm model as it mimics the oral cavity first using saliva to grow biofilm and second because the growth medium is a saliva analogue. Unlike other biofilms (single or dual-species), this model takes into account complex interactions between saliva constituents, micro-organisms and substratum types, and has been used previously to test different hypotheses.^{22,23}

In addition, we also evaluated the physico-mechanical properties of the materials used, as the incorporation of antimicrobial properties would be desirable, but the new material should keep its original physico-mechanical properties. For this aim, we decided to incorporate triazine directly to the powder of materials as it would be a simple and low cost measure in clinical practice. However, our hypothesis was rejected, since the addition of triazine in the acrylic resin and denture liners showed no significant reduction in total micro-organisms, total streptococci or *Candida* species.

The specific comparison between saliva donors was important to show that individuals that presents *Candida* in saliva but are healthy show differences in microflora. Therefore, this model may be used in future researches to test antimicrobials or to compare healthy and not healthy subjects. This finding is in accordance to the knowledge that the mere presence of *Candida* in the oral environment does not mean that the individual necessarily has or will develop *Candida*-related pathologies,^{19,24} as it depends on a complex fungi-bacteria-host interaction that modulates the host's response which may lead to inflammation. Nevertheless, if a slight inflammation is not controlled and plaque accumulation continues, this could have a detrimental impact on the patient's health. Moreover, they contribute as a significant mass to the biofilm as a result of their large size when compared with bacteria.²⁵ This study is in agreement with others,^{25,26} showing that the biofilm of prostheses is composed primarily of bacteria with a high prevalence of micro-organisms and *Streptococcus* while the yeasts are a small part of the total microbial flora.^{8,25,27} Our results showed that *Candida* species constitutes less than 1% of the total micro-organisms found in the formed biofilm for both saliva donors. Furthermore, higher counts of total micro-organisms and streptococci in our study could evidence the shift from a commensal oral flora to a pathogenic flora²⁸ and also supporting the idea that long time of biofilm accumulation due to lack of hygiene could be a predisposing factor to candidiasis development. The binding of these micro-organisms with acrylic of dentures allows they serve as a reservoir for the perpetuation of infection,²⁹ and surface irregularities would increase the likelihood of micro-organisms remaining on the surface. This is probably the reason why we have found higher counts of micro-organisms in both soft denture liners, as they also exhibited the highest surface roughness.

Denture liners and acrylic resins are widely used in dental practice, although it has been observed a frequent colonization and infection, for various *Candida* species, especially of soft denture liners, despite these materials may possess antifungal agents in their composition.^{9,27,30} For instance, we have compared two soft denture liners because one presented an antifungal. Still, no difference occurred with the addition of triazine probably corroborating other studies showing that the antifungal agent may be removed by the act of refreshing the growth medium.^{9,17}

All materials were exposed to identical laboratory environments so that responses could be compared. It was important to analyze the mechanical and structural properties of new biomaterials or modified materials. The release of antifungal agent is expected, but inferior properties of the material should not occur. Our findings have shown that the addition of triazine resulted in more soluble materials; however there was no change in roughness neither in flexural strength. So, when evaluating the solubility of the materials tested, it was possible to observe that the concentrations of 5% and 10% made the material more soluble. As to the sorption, CoeSoft and SoftConfort were the two materials with higher values for sorption, probably because in these materials plasticizers and other soluble materials are leached into the water more easily and water is absorbed by the polymer, which is consistent with other studies.³¹ Thus, these properties have been tested to predict clinical behavior and the longevity of the prosthetic materials, with ideal values low.³² Besides, according to our data, no change occurred in flexural strength of acrylic resin irrespective of the triazine concentration. This test is important to predict their clinical performance upon loading,^{33,34} related to midline fracture, since complete and removable dentures are subjected to repeated flexural forces.³⁵

Indeed, characteristics of materials, such as irregularities, porosity, absorption,³⁶ can promote the adherence of biofilm on the surface materials, since they are more protected against forces that tend to displace them in the early stages of colonization.^{37,38} Thus, despite the presence of antifungal agents in denture liners, its higher roughness favors the entrapment of yeast, confirming the data from our study, since in general, denture liners showed higher counts of micro-organisms and *Candida* species and higher roughness. Moreover, the oral cavity is an environment extremely rich in nutrients and may invalidate the inhibitory effect produced by the antifungals released from the denture liners.³⁹ A possible reason for the release of the antifungal agent of the denture liners do not have a beneficial effect on the adhesion of the micro-organisms is the constant bathing in saliva in the mouth,⁴⁰ facilitating candidal colonization of denture lining materials.⁴¹ In general, both soft denture liners showed a higher amount of *Candida* and total micro-organisms for all triazine concentrations; however, microwave-cured acrylic resin and Kooliner performed similarly, corroborating other studies³⁰ that also have shown greater adherence of micro-organisms to soft denture liners.

In our study we could not establish a beneficial effect of adding triazine, regardless of the concentrations added to different materials tested to decrease micro-organisms counts. It is important to highlight that our results does not rule out the possibility of using triazine. One of the limitations of our study was that we only used four materials and the biofilm although mature, was formed for 4 days only. However, the development of materials already containing triazine could result in different outcomes. Therefore it is necessary that more studies are conducted in order to obtain a prosthetic material with ideal mechanical properties and a lasting antimicrobial.

Acknowledgements

We thank FAPERGS for partially funding this work

References

1. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;**95**(1):51-59.
2. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J* 1998;**43**(1):45-50.
3. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;**10**(3):359-383.
4. Chandra J, D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick, M. A. Ghannoum. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;**183**:5385-5394.
5. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;**98**(1):53-59.
6. Branting C, Sund ML, Linder LE. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro. *Arch Oral Biol* 1989;**34**(5):347-353.
7. Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980;**25**(8-9):611-615.
8. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;**10** Suppl 1:E27-39.
9. Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont* 2007;**20**(3):308-310.
10. Sangshetti JN, Shinde DB. One pot synthesis and SAR of some novel 3-substituted 5,6-diphenyl-1,2,4-triazines as antifungal agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;**20**(2):742-745.
11. Xiong YZ, Chen FE, Balzarini J, De Clercq E, Pannecouque C. Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 11: structural modulations of diaryltriazines with potent anti-HIV activity. *Eur J Med Chem* 2008;**43**(6):1230-1236.
12. Baliani A, Bueno GJ, Stewart ML, Yardley V, Brun R, Barrett MP, et al. Design and synthesis of a series of melamine-based nitroheterocycles with activity against Trypanosomatid parasites. *J Med Chem* 2005;**48**(17):5570-5579.
13. Menicagli R, Samaritani S, Signore G, Vaglini F, Dalla Via L. In vitro cytotoxic activities of 2-alkyl-4,6-diheteroalkyl-1,3,5-triazines: new molecules in anticancer research. *J Med Chem* 2004;**47**(19):4649-4652.
14. Melato S, Prosperi D, Coghi P, Basilico N, Monti D. A combinatorial approach to 2,4,6-trisubstituted triazines with potent antimalarial activity: combining conventional synthesis and microwave-assistance. *ChemMedChem* 2008;**3**(6):873-876.
15. Zhou C, Min J, Liu Z, Young A, Deshazer H, Gao T, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 1,3,5-triazine derivatives as antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;**18**(4):1308-1311.

16. Cernicka J, Kozovska Z, Hnatova M, Valachovic M, Hapala I, Riedl Z, et al. Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. *Int J Antimicrob Agents* 2007;**29**(2):170-178.
17. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997;**77**(5):535-539.
18. Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol* 2007;**22**(2):73-79.
19. Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol* 2001;**46**(6):477-486.
20. Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;**54**(1):27-36.
21. Aps JK, LC M. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 2005;**150**(119-131).
22. Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries Res* 2009;**43**(2):97-102.
23. Sissons CH, Anderson SA, Wong L, Coleman MJ, White DC. Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries Res* 2007;**41**(5):413-422.
24. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;**8**(2):263-271.
25. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol* 2008;**53**(8):755-764.
26. Catalan A, Herrera R, Martinez A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: scanning electron microscopic and microbiologic study. *J Prosthet Dent* 1987;**57**(5):581-586.
27. Kulak Y, Kazazoglu E. In vivo and in vitro study of fungal presence and growth on three tissue conditioning materials on implant supported complete denture wearers. *J Oral Rehabil* 1998;**25**(2):135-138.
28. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res* 1974;**82**(2):151-190.
29. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004;**17**(2):255-267.
30. Wright PS, Clark P, Hardie JM. The prevalence and significance of yeasts in persons wearing complete dentures with soft-lining materials. *J Dent Res* 1985;**64**(2):122-125.
31. Braden M, Wright PS. Water absorption and water solubility of soft lining materials for acrylic dentures. *J Dent Res* 1983;**62**(6):764-768.
32. Kawano F, Dootz ER, Koran A, 3rd, Craig RG. Sorption and solubility of 12 soft denture liners. *J Prosthet Dent* 1994;**72**(4):393-398.
33. Hayden WJ. Flexural strength of microwave-cured denture baseplates. *Gen Dent* 1986;**34**(5):367-371.
34. Sato S, Cavalcante MR, Orsi IA, Paranhos Hde F, Zaniquelli O. Assessment of flexural strength and color alteration of heat-polymerized acrylic resins after simulated use of denture cleansers. *Braz Dent J* 2005;**16**(2):124-128.

35. Casemiro LA, Gomes Martins CH, Pires-de-Souza Fde C, Panzeri H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. *Gerodontology* 2008;**25**(3):187-194.
36. Boscato N, Delavi JD, Muller L, Pereira-Cenci T, Imanishi SW. Influence of varnish application on a tissue conditioner: analysis of biofilm adhesion. *Gerodontology* 2010;**27**(3):207-210.
37. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995;**22**(1):1-14.
38. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;**10**(1):99-116.
39. Graham BS, Jones DW, Burke J, Thompson JP. In vivo fungal presence and growth on two resilient denture liners. *J Prosthet Dent* 1991;**65**(4):528-532.
40. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci* 2008;**16**(2):86-94.
41. Nikawa H, Jin C, Hamada T, Murata H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans* in vitro. Part I. Effects on fungal growth. *J Oral Rehabil* 2000;**27**(1):41-51.

Table 1. Flexural strength values according to substratum type and triazine concentrations in MPa (mean $\pm$ SD).

	Control	2.5%	5%	10%
Flexural Strength	43.6 $\pm$ 17.6 A	39.0 $\pm$ 11.0 A	37.9 $\pm$ 14.0 A	29.0 $\pm$ 6.9 A

Upper case letters indicate statistically different results (one-way ANOVA, $p=0.059$).

Table 2. Water sorption and solubility values according to substratum type and triazine concentrations (mean $\pm$ SD) for the tested materials in $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ (mean $\pm$ SD).

	Solubility			
	Control	2.5%	5%	10%
CoeSoft	15.4 $\pm$ 2.6 a	19.5 $\pm$ 4.5 ab	22.2 $\pm$ 5.5 b	46.4 $\pm$ 5.4 c
SoftConfort	8.4 $\pm$ 1.7 a	18.5 $\pm$ 2.7 b	33.9 $\pm$ 5.0 c	63.5 $\pm$ 8.6 d
Acrylic resin	2.7 $\pm$ 1.8 a	0.8 $\pm$ 3.7 a	5.3 $\pm$ 2.6 a	8.4 $\pm$ 2.4 b
Kooliner	12.5 $\pm$ 2.7 a	13.7 $\pm$ 2.4 ab	22.8 $\pm$ 5.0 c	41.4 $\pm$ 5.4 d
	Sorption			
	Control	2.5%	5%	10%
CoeSoft	60.1 $\pm$ 21.0 a	50.4 $\pm$ 8.4 a	46.5 $\pm$ 4.1 a	54.9 $\pm$ 7.1 a
SoftConfort	41.6 $\pm$ 6.6 a	67.5 $\pm$ 24.1 b	56.4 $\pm$ 10.1 b	67.2 $\pm$ 3.3 b
Acrylic resin	13.6 $\pm$ 1.5 a	8.4 $\pm$ 1.4 b	10.9 $\pm$ 0.8 c	10.2 $\pm$ 1.1 c
Kooliner	45.5 $\pm$ 5.3 a	37.8 $\pm$ 5.2 b	36.7 $\pm$ 6.0 ab	43.0 $\pm$ 4.6 b

Different letters represent statistically significant values among triazine concentrations within the same material (one-way ANOVA and Tukey test, $p<0.05$).

Table 3. Surface roughness ($R_a - \mu\text{m}$) according to substratum type and triazine concentrations (mean $\pm$ SD).

	Control – 0%	2.5%	5.0%	10%
CoeSoft	1.3 $\pm$ 0.5 aAD	1.6 $\pm$ 0.3 aA	1.4 $\pm$ 0.4 aA	1.7 $\pm$ 0.6 aAB
SoftConfort	1.9 $\pm$ 0.7 abBD	1.7 $\pm$ 0.6 aAB	2.4 $\pm$ 0.7 aB	3.6 $\pm$ 1.2 bD
Acrylic resin	1.2 $\pm$ 0.6 aAD	0.9 $\pm$ 0.2 aC	0.9 $\pm$ 0.3 aC	1.2 $\pm$ 0.4 aAC
Kooliner	2.2 $\pm$ 0.4 aB	2.2 $\pm$ 0.4 aAB	1.8 $\pm$ 0.4 aAB	2.2 $\pm$ 0.5 aB

Different lower case letters represent statistically significant differences among triazine concentrations within the same material and upper case letters indicate statistically different results among materials (two-way ANOVA and Tukey test, $p<0.05$).

Table 4 – Total micro-organisms, total streptococci and *Candida* species counts according to saliva donors, materials and triazine concentrations (mean $\pm$ SE). *Indicates differences between salivas; Upper case letters represents differences among materials.

Material	% triazine	Total streptococci (CFU x 10 ⁶)		Total microorganisms (CFU x 10 ⁷)		<i>Candida</i> species (CFU x 10 ³)	
		Healthy	Candidiasis	Healthy	Candidiasis	Healthy	Candidiasis
Acrylic resin	Control	1,53 $\pm$ 0,94	0,37 $\pm$ 0,15*	0,63 $\pm$ 0,47	6,61 $\pm$ 5,34*	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	2.5%	2,24 $\pm$ 1,06	0,21 $\pm$ 0,15*	1,31 $\pm$ 0,94	0,43 $\pm$ 0,11*	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,2
	5%	0,47 $\pm$ 0,13	0,07 $\pm$ 0,02*	2,55 $\pm$ 1,6	0,66 $\pm$ 0,21*	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,2
	10%	0,57 $\pm$ 0,28	0,98 $\pm$ 0,50*	0,74 $\pm$ 0,45	0,66 $\pm$ 0,29*	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Soft Confort	Control	8,73 $\pm$ 6,36	1,30 $\pm$ 0,91*	0,24 $\pm$ 0,11	2,52 $\pm$ 1,34*	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	2.5%	5,26 $\pm$ 4,50	2,81 $\pm$ 2,01*	1,2 $\pm$ 0,73	0,59 $\pm$ 0,21*	0,0 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 3,5
	5%	0,23 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,22*	0,66 $\pm$ 0,29	4,04 $\pm$ 2,25*	0,0 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 2,1
	10%	0,26 $\pm$ 0,15	0,20 $\pm$ 0,09*	1,8 $\pm$ 1,6	0,31 $\pm$ 0,17*	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Coe Soft	Control	7,73 $\pm$ 2,88	0,63 $\pm$ 0,09*	4 $\pm$ 1,5	8,57 $\pm$ 2,04*	2,4 $\pm$ 1,5	8,2 $\pm$ 5,1
	2.5%	3,80 $\pm$ 1,34	3,76 $\pm$ 1,97*	2,1 $\pm$ 1,2	15,8 $\pm$ 9,56*	2,8 $\pm$ 1,9	1,1 $\pm$ 0,8
	5%	2,96 $\pm$ 1,83	2,49 $\pm$ 0,74*	1,1 $\pm$ 0,37	4,74 $\pm$ 0,89*	5,9 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 1,8
	10%	2,24 $\pm$ 1,22	0,59 $\pm$ 0,22*	0,91 $\pm$ 0,72	0,82 $\pm$ 0,22*	2,2 $\pm$ 1,3	16,3 $\pm$ 8,9
Kooliner	Control	5,45 $\pm$ 2,61	0,35 $\pm$ 0,14*	1,7 $\pm$ 1,3	3,13 $\pm$ 1,14*	0,5 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,6
	2.5%	3,37 $\pm$ 2,61	0,48 $\pm$ 0,18*	2,3 $\pm$ 1,2	2,41 $\pm$ 1,23*	0,3 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0
	5%	29,1 $\pm$ 26,5	0,49 $\pm$ 0,28*	3,5 $\pm$ 1,4	1,86 $\pm$ 1,12*	1,3 $\pm$ 1,3	0,8 $\pm$ 0,8
	10%	3,93 $\pm$ 1,08	0,69 $\pm$ 0,18*	2,9 $\pm$ 1,6	1,04 $\pm$ 0,16*	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,6

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem inferir que:

- A adição de triazina aos materiais testados independentemente da sua concentração não foi benéfica em reduzir a aderência de *Candida*.
- A adição de triazina diretamente aos reembasadores e resina acrílica modificou suas propriedades mecânicas, especialmente nas concentrações de 5 e 10%.

Referências

AVON SL; GOULET JP; DESLAURIERS N. Removable acrylic resin disk as a sampling system for the study of denture biofilms in vivo. **J Prosthet Dent** 2007;97:32-8.

BAENA-MONROY T; MORENO-MALDONADO V; FRANCO-MARTINEZ F; ALDAPE-BARRIOS B; QUINDOS G; SANCHEZ-VARGAS LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2005;10 Suppl 1:E27-39.

BALIANI A; BUENO GJ; STEWART ML; YARDLEY V; BRUN R; BARRETT MP; GILBERT IH. Design and synthesis of a series of melamine-based nitroheterocycles with activity against *Trypanosomatid* parasites. **J Med Chem** 2005;48:5570-9.

BARBEAU J; SEGUIN J; GOULET JP; DE KONINCK L; AVON SL; LALONDE B; ROMPRE P; DESLAURIERS N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2003;95:51-9.

BELLON-FONTAINE MN; MOZES N; VAN DER MEI HC; SJOLLEMA J; CERF O; ROUXHET PG; BUSSCHER HJ. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. **Cell Biophys** 1990;17:93-106.

BEYLI MS; VON FRAUNHOFER JA. An analysis of causes of fracture of acrylic resin dentures. **J Prosthet Dent** 1981;46:238-41.

BOSCATO N; DELAVI JD; MULLER L; PEREIRA-CENCI T; IMANISHI SW. Influence of varnish application on a tissue conditioner: analysis of biofilm adhesion. **Gerodontology** 2010;27:207-10.

BOSCATO N; RADAVELLI A; FACCIO D; LOGUERCIO AD. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of a soft denture-lining material. **Gerodontology** 2009;26:210-3.

BRANTING C; SUND ML; LINDER LE. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro. **Arch Oral Biol** 1989;34:347-53.

BUDTZ-JORGENSEN E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. **J Am Dent Assoc** 1978;96:474-9.

BUDTZ-JORGENSEN E. Denture stomatitis. IV. An experimental model in monkeys. **Acta Odontol Scand** 1971;29:513-26.

BUDTZ-JORGENSEN E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand J Dent Res** 1974;82:151-90.

BUDTZ-JORGENSEN E; THEILADE E; THEILADE J. Quantitative relationship between yeast and bacteria in denture-induced stomatitis. **Scand J Dent Res** 1983;91:134-42.

BUSSCHER HJ; COWAN MM; VAN DER MEI HC. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. **FEMS Microbiol Rev** 1992;8:199-209.

CAMPOS MS; MARCHINI L; BERNARDES LA; PAULINO LC; NOBREGA FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol** 2008;23:419-24.

CANNON RD; CHAFFIN WL. Oral colonization by *Candida albicans*. **Crit Rev Oral Biol Med** 1999;10:359-83.

CANNON RD; HOLMES AR; MASON AB; MONK BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res** 1995;74:1152-61.

CATALAN A; HERRERA R; MARTINEZ A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: scanning electron microscopic and microbiologic study. **J Prosthet Dent** 1987;57:581-6.

CENCI T. **Avaliação da formação de biofilme de espécies de *Candida* sobre a superfície de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses removíveis**. Tese. Tatiana Pereira Cenci -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.

CERNICKA J; KOZOVSKA Z; HNATOVA M; VALACHOVIC M; HAPALA I; RIEDL Z; HAJOS G; SUBIK J. Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. **Int J Antimicrob Agents** 2007;29:170-8.

CERVEIRA NETTO H; LIN D. Condicionadores teciduais. **Rev Fac Odont São José dos Campos** 1977;6:101-04.

CHANDRA J; KUHN DM; MUKHERJEE PK; HOYER LL; MCCORMICK T; GHANNOUM MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol** 2001;183:5385-94.

CRAIG RG. Inflammation, cardiovascular disease and destructive periodontal diseases. The evolving role of the dental profession. **N Y State Dent J** 2004;70:22-6.

DOREY JL; BLASBERG B; MACENTEE MI; CONKLIN RJ. Oral mucosal disorders in denture wearers. **J Prosthet Dent** 1985;53:210-3.

DOUGLAS LJ. *Candida* biofilms and their role in infection **Trends Microbiol** 2003;11:30-36.

EDGERTON M; SCANNAPIECO FA; REDDY MS; LEVINE MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. **Infect Immun** 1993;61:2644-52.

FIGUEIRAL MH; AZUL A; PINTO E; FONSECA PA; BRANCO FM; SCULLY C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. **J Oral Rehabil** 2007;34:448-55.

FILOCHE SK; SOMA KJ; SISSONS CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiol Immunol** 2007;22:73-9.

GARCIA RM; LEON BT; OLIVEIRA VB; DEL BEL CURY AA. Effect of a denture cleanser on weight, surface roughness, and tensile bond strength of two resilient denture liners. **J Prosthet Dent** 2003;89:489-94.

GUSBERTI FA; GADA TG; LANG NP; GEERING AH. Cultivable microflora of plaque from full denture bases and adjacent palatal mucosa. **J Biol Buccale** 1985;13:227-36.

HOLMES AR; CANNON RD; JENKINSON HF. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J Ind Microbiol** 1995;15:208-13.

IACOPINO AM; WATHEN WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. **J Am Dent Assoc** 1992;123:46-51.

ISO. International Organization for Standardization. Dentistry - polymer-based crown and bridge materials. **No 10477, 1992 and 1, Geneve, Switzerland,**

1998;

JENKINSON HF; DOUGLAS LJ. Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections. In: **Brogden KA, Guthmiller JM, ed. Polymicrobial diseases. ASM Press** 2002;15:357-73.

KOLENBRANDER PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu Rev Microbiol** 2000;54:413-37.

KOOPMANS AS; KIPPUW N; DE GRAAFF J. Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. **J Dent Res** 1988;67:1246-50.

KULAK Y; ARIKAN A; ALBAK S; OKAR I; KAZAZOGLU E. Scanning electron microscopic examination of different cleaners: surface contaminant removal from dentures. **J Oral Rehabil** 1997;24:209-15.

KULAK Y; KAZAZOGLU E. In vivo and in vitro study of fungal presence and growth on three tissue conditioning materials on implant supported complete denture wearers. **J Oral Rehabil** 1998;25:135-8.

KUMAMOTO CA. *Candida* biofilms. **Curr Opin Microbiol** 2002;5:608-11.

KUMAMOTO CA; VINCES MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. **Annu Rev Microbiol** 2005;59:113-33.

LAI CP; TSAI MH; CHEN M; CHANG HS; TAY HH. Morphology and properties of denture acrylic resins cured by microwave energy and conventional water bath. **Dent Mater** 2004;20:133-41.

MACK PJ. Denture soft lining materials: clinical indications. **Aust Dent J** 1989;34:454-8.

MARSH PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res** 1994;8:263-71.

MCCABE JF. A polyvinylsiloxane denture soft lining material. **J Dent** 1998;26:521-6.

MCMICHAEL AJ; MCKEE M; SHKOLNIKOV V; VALKONEN T. Mortality trends and setbacks: global convergence or divergence? **Lancet** 2004;363:1155-9.

MELATO S; PROSPERI D; COGHI P; BASILICO N; MONTI D. A combinatorial approach to 2,4,6-trisubstituted triazines with potent antimalarial activity: combining conventional synthesis and microwave-assistance. **ChemMedChem** 2008;3:873-6.

MENICAGLI R; SAMARITANI S; SIGNORE G; VAGLINI F; DALLA VIA L. In vitro cytotoxic activities of 2-alkyl-4,6-diheteroalkyl-1,3,5-triazines: new molecules in anticancer research. **J Med Chem** 2004;47:4649-52.

MILLSAP KW; BOS R; VAN DER MEI HC; BUSSCHER HJ. Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. **Antonie Van Leeuwenhoek** 1999;75:351-9.

MUZIKA BC. Oral fungal infections **Dent Clin North Am** 2005;49:49-65.

NEVZATOGLU EU; OZCAN M; KULAK-OZKAN Y; KADIR T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. **Clin Oral Investig** 2007;11:231-6.

NIKAWA H; HAMADA T. Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans* in vitro. **Arch Oral Biol** 1990;35:571-3.

NIKAWA H; IWANAGA H; KAMEDA M; HAMADA T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. **J Prosthet Dent** 1992;68:804-8.

NIKAWA H; JIN C; MAKIHIRA S; EGUSA H; HAMADA T; KUMAGAI H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. **J Oral Rehabil** 2003;30:243-50.

NIKAWA H; YAMAMOTO T; HAMADA T; RAHARDJO MB; MURATA H; NAKANODA S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. **J Oral Rehabil** 1997;24:350-7.

NUCCI M; MARR KA. Emerging fungal diseases. **Clin Infect Dis** 2005;41:521-6.

OKITA N; ORSTAVIK D; ORSTAVIK J; OSTBY K. In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. **Dent Mater** 1991;7:155-60.

PEREIRA-CENCI T; CURY AA; CENCI MS; RODRIGUES-GARCIA RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. **Int J Prosthodont** 2007;20:308-10.

PEREIRA-CENCI T; DA SILVA WJ; CENCI MS; CURY AA. Temporal changes of denture plaque microbiologic composition evaluated in situ. **Int J Prosthodont** 2010;23:239-42.

PEREIRA-CENCI T; DEL BEL CURY AA; CRIELAARD W; TEN CATE JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. **J Appl Oral Sci** 2008;16:86-94.

PEREIRA-CENCI T; DENG DM; KRANEVELD EA; MANDERS EM; DEL BEL CURY AA; TEN CATE JM; CRIELAARD W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. **Arch Oral Biol** 2008;53:755-64.

PEREZOUS LF; FLAITZ CM; GOLDSCHMIDT ME; ENGELMEIER RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. **J Prosthet Dent** 2005;93:288-93.

QUDAH S; HARRISON A; HUGGETT R. Soft lining materials in prosthetic dentistry: a review. **Int J Prosthodont** 1990;3:477-83.

RADFORD DR; CHALLACOMBE SJ; WALTER JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. **Crit Rev Oral Biol Med** 1999;10:99-116.

RAMAGE G; SAVILLE SP; THOMAS DP; LOPEZ-RIBOT JL. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot Cell** 2005;4:633-8.

RAMAGE G; TOMSETT K; WICKES BL; LOPEZ-RIBOT JL; REDDING SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2004;98:53-9.

ROSAN B; LAMONT RJ. Dental plaque formation. **Microbes Infect** 2000;2:1599-607.

SAMARANAYAKE LP; MCCOURTIE J; MACFARLANE TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. **Arch Oral Biol** 1980;25:611-5.

SAN MILLAN R; ELGUEZABAL N; REGULEZ P; MORAGUES MD; QUINDOS G; PONTON J. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. **Microbiology** 2000;146 (Pt 9):2105-12.

SANGSHETTI JN; SHINDE DB. One pot synthesis and SAR of some novel 3-substituted 5,6-diphenyl-1,2,4-triazines as antifungal agents. **Bioorg Med Chem Lett** 2010;20:742-5.

SEGAL E. *Candida*, still number one--what do we know and where are we going from there? **Mycoses** 2005;48 Suppl 1:3-11.

SRINIVAS K; SRINIVAS U; BHANUPRAKASH K; HARAKISHORE K; MURTHY US; RAO VJ. Synthesis and antibacterial activity of various substituted s-triazines. **Eur J Med Chem** 2006;41:1240-6.

TARI BF; NALBANT D; DOGRUMAN AL F; KUSTIMUR S. Surface roughness and adherence of *Candida albicans* on soft lining materials as influenced by accelerated aging. **J Contemp Dent Pract** 2007;8:18-25.

TEIXEIRA ML; MEZZARI A. Prevalência de *Candida albicans* e não-*albicans* em próteses dentárias **NewsLab** 2005;Ed 70:

TENUTA LM; RICOMINI FILHO AP; DEL BEL CURY AA; CURY JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. **Caries Res** 2006;40:546-9.

THURNHEER T; GMUR R; SHAPIRO S; GUGGENHEIM B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. **Appl Environ Microbiol** 2003;69:1702-9.

TULJAPURKAR S; LI N; BOE C. A universal pattern of mortality decline in the G7 countries. **Nature** 2000;405:789-92.

VERRAN J; MARYAN CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. **J Prosthet Dent** 1997;77:535-9.

WARGO MJ; HOGAN DA. Fungal--bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. **Curr Opin Microbiol** 2006;9:359-64.

WEBB BC; THOMAS CJ; WILLCOX MD; HARTY DW; KNOX KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Aust Dent J** 1998;43:45-50.

WHO. The world health report. reducing risks, promoting healthy life. **Geneva: World Health Organization**

2003;186–94.

WILSON M. Bacterial biofilms and human disease. **Sci Prog** 2001;84:235-54.

WONG L; SISSONS C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Arch Oral Biol** 2001;46:477-86.

WRIGHT PS; CLARK P; HARDIE JM. The prevalence and significance of yeasts in persons wearing complete dentures with soft-lining materials. **J Dent Res** 1985;64:122-5.

XIONG YZ; CHEN FE; BALZARINI J; DE CLERCQ E; PANNECOUQUE C. Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 11: structural modulations of diaryltriazines with potent anti-HIV activity. **Eur J Med Chem** 2008;43:1230-6.

ZAREMBA ML; DANILUK T; ROZKIEWICZ D; CYLWIK-ROKICKA D; KIERKLO A; TOKAJUK G; DABROWSKA E; PAWINSKA M; KLIMIUK A; STOKOWSKA W; ABDELRAZEK S. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. **Adv Med Sci** 2006;51 Suppl 1:233-6.

ZHOU C; MIN J; LIU Z; YOUNG A; DESHAZER H; GAO T; CHANG YT; KALLENBACH NR. Synthesis and biological evaluation of novel 1,3,5-triazine derivatives as antimicrobial agents. **Bioorg Med Chem Lett** 2008;18:1308-11.

ZHOU L; TONG Z; WU G; FENG Z; BAI S; DONG Y; NI L; ZHAO Y. Parylene coating hinders *Candida albicans* adhesion to silicone elastomers and denture bases resin. **Arch Oral Biol** 2010;55:401-9.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está convidado a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é das pesquisadoras responsáveis. Alertamos que não existem riscos envolvidos neste estudo e em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Esclarecemos que a participação é decorrente de sua livre decisão, após receber todas as informações que julgar necessárias, e que poderá ser a qualquer tempo, retirada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Efeito da triazina nas propriedades mecânicas e formação de biofilme em resina acrílica e reembasadores de prótese.

Pesquisadores participantes: Aline Pinheiro de Moraes

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci

Prezado paciente, nossa pesquisa tem como objetivo principal avaliar sua saúde bucal, principalmente em relação a presença de *Candida* e a influência deste fungo na formação de biofilme, ou seja placa bacteriana. Para isso, será realizada coleta de biofilme da sua mucosa oral e próteses utilizando um swab esterilizado, que é semelhante a um grande cotonete e coleta de sua saliva. A coleta do material quanto será realizada na Faculdade de Odontologia. Será preservada a identidade e os resultados individuais não serão divulgados. A tua participação é de extrema importância para que possamos estabelecer medidas preventivas a essa colonização.

Telefone para contato: 81114509 / 32226690 R. 162

**APÊNDICE 2**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO E
RESPONSÁVEL LEGAL

Eu, _____,
RG/CI _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo para avaliar a saúde bucal, principalmente em relação a presença de *Candida* e a influência deste fungo na formação de biofilme, ou seja placa bacteriana. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, e os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento/ assistência/tratamento.

Pelotas, ____ de _____ de 2010.

Assinatura

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PELOTAS, 12 de junho de 2009.

PARECER N° 099/2009

O projeto de pesquisa intitulado **AVALIAÇÃO DE CANDIDA EM PACIENTES USUÁRIOS DE PRÓTESE TOTAL SAUDÁVEIS E NÃO SAUDÁVEIS E SEUS EFEITOS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME** está constituído de forma adequada, cumprindo, na suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.

Prof.º. Marcos Antonio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPel

Prof. Marcos A. Torriani
Coordenador
Comitê de Ética e Pesquisa