



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto

MONOGRAFIA DE INVESTIGAÇÃO

**ADSORÇÃO DE CLOREXIDINA
POR MATERIAIS DE REBASAMENTO DE PRÓTESE**

**CHLORHEXIDINE ADSORPTION
BY DENTURE RELINING MATERIALS**

João Pedro da Cunha Torres Vieira

Porto, 2021



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto

MONOGRAFIA DE INVESTIGAÇÃO

**ADSORÇÃO DE CLOREXIDINA
POR MATERIAIS DE REBASAMENTO DE PRÓTESE**

**CHLORHEXIDINE ADSORPTION
BY DENTURE RELINING MATERIALS**

ESTUDANTE

Nome completo: João Pedro da Cunha Torres Vieira

Nº de estudante: 201702848

Correio eletrónico: joaopedrovieira.13@gmail.com

ORIENTADORA

Nome Completo: Maria Margarida Ferreira Sampaio Fernandes

Grau académico: Doutoramento

Título profissional: Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto

COORDINADORA

Nome Completo: Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva

Grau académico: Agregação

Título profissional: Professora Catedrática da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade
do Porto

“Somos feitos da matéria de que são feitos os sonhos”

William Shakespeare

Agradecimentos

... e porque a realização deste sonho não faria sentido sem as pessoas certas do meu lado, resta-me agradecer a todas as que caminharam comigo neste percurso:

À Professora Doutora Maria Margarida Sampaio Fernandes pela oportunidade, orientação e total disponibilidade demonstradas ao longo da elaboração deste projeto.

À Professora Doutora Maria Helena Figueiral pela sua dedicação e apoio que foram determinantes para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Helena Fernandes e à Professora Doutora Liliana Grenho que sem hesitar aceitaram colaborar neste projeto e pela incansável disponibilidade.

À Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto que me permitiu a realização deste sonho e a todos os docentes pelos ensinamentos de excelência que me transmitiram. Foi um privilégio poder aprender com vocês! Espero honrar sempre o nome desta nobre instituição!

Aos meus pais, Augusto e Maria Otília, por me terem apoiado desde o primeiro segundo na realização deste sonho, porque tudo o que faço é por vocês e a pensar em vocês. Espero que estejam orgulhosos de mim! São o meu maior exemplo!

Aos meus irmãos, Gusto, Ana e Rita, por nunca me deixarem desistir e acreditarem sempre em mim. Obrigado por estarem sempre presentes nesta caminhada!

Aos meus sobrinhos que alegraram sempre os meus dias!

Às novas amigas e às de sempre, por estarem sempre do meu lado!

Por fim, um agradecimento especial à minha Sara pela sua presença constante, companheirismo e amor. Obrigado por me fazeres sonhar e, essencialmente, por dares sentido aos meus sonhos! Fizeste com que tudo parecesse fácil, mesmo quando não o era.

Obrigado a todos!

Resumo

Introdução: A estomatite protética é descrita como um processo inflamatório da mucosa subjacente à prótese dentária removível. É a patologia com maior prevalência em utilizadores de prótese, geralmente assintomática, com localização preferencial no palato que afeta mais as mulheres. Considerada uma patologia multifatorial, a sua etiologia é complexa, mas evidências científicas sugerem uma forte associação entre estomatite protética e *Candida spp*, nomeadamente *Candida albicans* (*C. albicans*). O seu tratamento deve ser adequado ao diagnóstico e direcionado à superfície da prótese e à mucosa oral. Uma das estratégias mais recentes no tratamento da doença consiste na libertação localizada de agentes antimicrobianos utilizando materiais de rebasamento como meio de transporte.

Objetivos: O principal objetivo deste estudo é investigar se a veiculação de clorexidina, através da adsorção na superfície de materiais de rebasamento, pode constituir uma estratégia terapêutica eficaz para combater a estomatite protética. Para tal, este estudo tem como objetivos específicos avaliar: i) a capacidade da superfície de dois materiais de rebasamento adsorver clorexidina, pelo método de imersão em solução; ii) a influência da concentração das soluções e do tempo de imersão na quantidade de clorexidina adsorvida; iii) o perfil de libertação da clorexidina; iv) a manutenção da atividade antifúngica da clorexidina libertada contra *C. albicans*; v) a citotoxicidade induzida em fibroblastos pela clorexidina libertada; e vi) a capacidade de recarga da superfície dos materiais após lixiviação completa.

Metodologia: Os provetes em forma de disco foram preparados a partir dos materiais de rebasamento, Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C, utilizando moldes e de acordo com as indicações do fabricante. A capacidade da superfície dos materiais adsorver e libertar clorexidina foi avaliada através de espectrofotometria. A manutenção da atividade antifúngica da clorexidina libertada contra *C. albicans* ATCC 10231 e a citotoxicidade induzida em fibroblastos L929 foram determinadas usando o teste de difusão em agar e o ensaio do MTT, respetivamente.

Resultados: Os ensaios realizados mostram que a superfície dos materiais tem capacidade para adsorver clorexidina e que esta se liberta rapidamente, em minutos, após imersão em água. Os materiais incubados em soluções com maiores concentrações de clorexidina libertaram maiores concentrações do agente antimicrobiano e, conseqüentemente, apresentaram maior atividade antifúngica. Ambos os materiais apresentaram ainda capacidade de recarga da sua superfície após lixiviação completa. As condições que libertaram uma concentração de clorexidina maior do que a concentração mínima inibitória e menor do que os valores de citotoxicidade identificados na literatura, foram também avaliadas quanto à sua citotoxicidade em fibroblastos, exibindo um efeito dependente da concentração. O material de rebasamento Ufi Gel® hard C apresenta maior capacidade de veiculação de clorexidina.

Conclusão: Os resultados sugerem que a veiculação de clorexidina através da adsorção na superfície de materiais de rebasamento pode constituir uma estratégia terapêutica útil e prática de ação antifúngica para combater a estomatite protética.

Palavras-chave: “Estomatite protética”, “clorexidina”, “diagnóstico”, “classificação”, “etiologia”, “tratamento”, “adsorção”, “incorporação”.

Abstract

Introduction: Denture stomatitis is described as an inflammatory process of the mucosa underlying the removable dental prosthesis. It is the pathology with the highest prevalence in denture wearers, generally asymptomatic, with preferential location on the palate that affects women the most. Considered a multifactorial pathology, its etiology is complex, but scientific evidence suggests a strong association between denture stomatitis and *Candida spp*, namely *Candida albicans* (*C. albicans*). The treatment must be suitable for diagnosis and directed to the denture surface and oral mucosa. One of the most recent strategies in the treatment of denture stomatitis is the localized release of antimicrobial agents using relining materials as delivery systems.

Objectives: The main objective of this study is to investigate if the delivery of chlorhexidine, by adsorption on the surface of relining materials, can be an effective therapeutic strategy to combat an denture stomatitis. For that, this study has as specific objectives to evaluate: i) the capacity of the surface of two relining materials to adsorb chlorhexidine, by immersion in solution; ii) the influence of the concentration of the immersion solutions and the immersion time on the amount of chlorhexidine adsorbed; iii) the chlorhexidine release profile; iv) the maintenance of the antifungal activity of chlorhexidine released against *C. albicans*; v) the cytotoxicity induced by chlorhexidine released in fibroblasts; and vi) the ability to recharge the surface of the materials after complete leaching.

Methodology: The disk-shaped test pieces were prepared from the relining materials, Ufi Gel® SC and Ufi Gel® hard C, using molds and according to the manufacturer's instructions. The surface capacity of the materials to adsorb and release chlorhexidine was evaluated spectrophotometrically. The maintenance of the antifungal activity of chlorhexidine released against *C. albicans* ATCC 10231 and the cytotoxicity induced in fibroblasts L929 were determined using the agar diffusion test and the MTT assay, respectively.

Results: The trials carried out showed that the surface of the materials has the capacity to adsorb chlorhexidine, and it desorbs quickly, within minutes, after immersion in water. The materials incubated with higher concentrations of chlorhexidine released higher concentrations of the antimicrobial agent and, consequently, showed greater antifungal activity. Both materials also showed the ability to recharge their surface after complete leaching. These results were higher for the hard-relining material Ufi Gel® hard C. The conditions that released a concentration of chlorhexidine higher than minimum inhibitory concentration and lower than cytotoxic values present in the literature, were also evaluated regarding their cytotoxicity with fibroblasts cells, exhibiting a concentration-dependent effect.

Conclusion: The results suggest that the delivery of chlorhexidine through the adsorption on the surface of relining materials might provide a useful and practical strategy of antifungal action to tackle denture stomatitis.

Keywords: “denture-related stomatitis”, “denture-induced stomatitis”, “diagnosis”, “classification”, “etiology”, “treatment”, “chlorhexidine”, “adsorption”, “incorporation”.

Índice Geral

Agradecimentos	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Índice de figuras.....	xv
Índice de tabelas	xvii
Siglas e abreviaturas.....	xviii
1. Introdução	1
1.1 Estomatite protética.....	2
1.2 Clorexidina.....	6
1.3 Objetivos do estudo	8
2. Material e métodos.....	10
2.1 Materiais	10
2.2 Preparação dos provetes.....	11
2.3 Adsorção da clorexidina	12
2.4 Liberação da clorexidina.....	13
2.5 Microrganismos e condições de cultura.....	13
2.6 Concentração mínima inibitória da clorexidina para <i>C. albicans</i>	14
2.7 Atividade antifúngica da clorexidina libertada.....	15
2.8 Recarga dos materiais.....	15
2.9 Atividade da clorexidina na eliminação do biofilme de <i>C. albicans</i>	16
2.10 Citotoxicidade da clorexidina libertada	17
2.11 Análise estatística.....	18

3. Resultados	19
3.1 Adsorção e cinética de liberação da clorexidina	19
3.2 Atividade antifúngica da clorexidina para <i>C. albicans</i>	21
3.3 Atividade antifúngica da clorexidina libertada	23
3.4 Recarga dos materiais	25
3.5 Citotoxicidade da clorexidina libertada	27
4. Discussão.....	29
5. Conclusão	35
Referências bibliográficas	36
Anexos	45
Declaração de autoria.....	46
Parecer da orientadora para entrega definitiva do trabalho apresentado	47
Parecer da coorientadora para entrega definitiva do trabalho apresentado.	48

Índice de Figuras

Figura 1: Rebasamento mole de prótese acrílica removível pelo método direto.....	2
Figura 2: Classificação da EP segundo Newton.	3
Figura 3: Estrutura química da clorexidina.	7
Figura 4: Materiais utilizados no estudo. a) Ufi Gel® SC; b) Ufi Gel® hard C; e c) Digluconato de clorexidina a 20%.	10
Figura 5: a) Fase do processo de confecção dos provetes. Exemplares dos provetes utilizados no estudo: b) Ufi Gel® SC e c) Ufi Gel® hard C.....	11
Figura 6: Proвете de Ufi Gel® hard C imerso em solução de CHX.....	12
Figura 7: Registo da morfologia e densidade celular em microscópio invertido com contraste de fase.....	18
Figura 8: Cinética de libertação da CHX adsorvida pela superfície dos materiais Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%).	19
Figura 9: Libertação cumulativa da CHX adsorvida pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%). Influência da variação da concentração das soluções de imersão.	20
Figura 10: Libertação cumulativa da CHX adsorvida pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%). Influência da variação do tempo de imersão..	20
Figura 11: Avaliação do efeito de soluções de CHX na eliminação de um biofilme de 24 horas de <i>C. albicans</i> , através da análise da atividade metabólica das leveduras pelo método da resazurina e do número de células cultiváveis pela quantificação das CFU/mL. RFU - unidades relativas de fluorescência.	22

Figura 12: Halos de inibição determinados para a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%). Influência da variação da concentração das soluções de imersão.	23
Figura 13: Halos de inibição determinados para a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%). Influência da variação do tempo de imersão.	23
Figura 14: Representação fotográfica dos halos de inibição determinados para a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%).	24
Figura 15: Cinética de libertação e libertação cumulativa da CHX adsorvida pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C recarregados, após 8 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (1% e 2,5%).	25
Figura 16: Halos de inibição determinados para a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C recarregados, após 8 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (1% e 2,5%). Representação fotográfica dos resultados obtidos em cada condição experimental.....	26
Figura 17: Viabilidade celular dos fibroblastos após 1 h, 3 h e 24 h de contacto com a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C, após 8 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (1% e 2,5%). Representação microscópica das células após metabolização do MTT, para as várias condições avaliadas.....	27

Índice de Tabelas

Tabela I: Descrição dos materiais de rebasamento e da CHX utilizados no estudo.	10
Tabela II: MIC e MBC da CHX determinadas para <i>C. albicans</i>	21

Siglas e abreviaturas

EP	Estomatite protética
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CHX	Clorexidina
UV	Ultravioleta
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFU	Unidade formadora de colónia
MIC	Concentração mínima inibitória
MBC	Concentração mínima bactericida
ISO	Organização internacional para a padronização
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
α -MEM	<i>α-Minimal Essential Medium</i>
UI	Unidades internacionais
CO ₂	Dióxido de carbono
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
RFU	Unidades relativas de fluorescência

1. Introdução

A saúde oral é um elemento essencial da saúde geral, que se reflete na qualidade de vida de cada indivíduo¹⁻³. O envelhecimento da população é um fator de risco para a saúde oral e é expectável que se torne mais prevalente nas próximas décadas^{3,4}.

Apesar da evolução e melhoria da prevenção e dos tratamentos médico-dentários, uma parte substancial da população adulta apresenta ausência total ou parcial da dentição, o que conduz à necessidade de reabilitação oral, com recurso a próteses dentárias⁵⁻⁹. A prostodontia é a área da medicina dentária responsável pela reabilitação de zonas edêntulas, com o intuito de recuperar a função oral e o conforto do paciente, devolvendo a harmonia e estética orofacial, potenciando assim uma melhor saúde oral e consequente melhoria da qualidade de vida do paciente¹⁰⁻¹².

A cavidade oral é um ambiente complexo que está continuamente exposto a inúmeros microrganismos patogénicos oportunistas e a colocação de prótese pode comprometer o estado de equilíbrio do seu microbioma, favorecendo o desenvolvimento de determinadas patologias na mucosa oral, como a estomatite protética (EP)¹³⁻¹⁶.

O uso prolongado de prótese dentária acentua o processo fisiológico de reabsorção óssea alveolar, podendo provocar desadaptação da prótese. Neste sentido, é fundamental avaliar a necessidade de substituição da prótese ou de ajustar a superfície interna da sua base com o intuito de melhorar a adaptação aos tecidos de suporte recorrendo a técnicas de rebasamento, de forma direta ou indireta (Figura 1)¹⁷⁻¹⁹.

Os materiais de rebasamento podem ser classificados em materiais de rebasamento moles ou duros, apresentando entre si diferenças a nível químico e estrutural^{17,20}. Idealmente estes materiais são caracterizados pela biocompatibilidade com os tecidos da cavidade oral, estabilidade de forma e cor, e devem ainda apresentar resistência à abrasão provocada pelas condições variáveis do ambiente oral e pelos procedimentos de higienização²¹. As suas principais indicações clínicas incidem nas situações de atrofia e reabsorção da crista alveolar, para aumento de retenção e estabilidade das próteses, alívio e amortecimento de zonas de compressão, auxílio na cicatrização de úlceras presentes na mucosa e prolongamento dos bordos da prótese^{19,20,22}.



Figura 1: Rebasamento mole de prótese acrílica removível pelo método direto¹⁹.

1.1 Estomatite protética

A EP é descrita como um processo inflamatório da mucosa subjacente à prótese dentária removível parcial ou total^{17,23-25}. É a condição oral com maior incidência em utilizadores de prótese, podendo afetar até cerca de 70%, e é a mais descrita na população idosa^{4,25-27}. Esta doença localiza-se essencialmente na arcada superior, mais especificamente no palato, sendo mais prevalente nas mulheres. Geralmente é assintomática, contudo pode estar associada a sensibilidade dolorosa, queimadura, sangramento, halitose, disgeusia e dificuldade de deglutição^{6,23,25,28,29}. Quando diagnosticada, a EP deve ser sempre tratada, mesmo quando presente em condições leves ou assintomáticas, de modo a impedir a sua progressão³⁰.

O diagnóstico da EP é, na maioria dos casos, baseado nos sintomas e sinais clínicos, juntamente com uma história clínica completa, podendo ser complementado com exames laboratoriais (citopatologia ou cultura microbiológica). Devido à semelhança clínica, recomenda-se a realização do diagnóstico diferencial com alergias aos materiais da prótese (polimetilmetacrilato e ligas metálicas) e nas situações em que, após tratamento, persistem lesões residuais irreversíveis deve ser realizado diagnóstico diferencial para leucoplasias^{6,25,29,30}.

Para avaliar a severidade inflamatória da EP, a classificação mais frequentemente utilizada é a de Newton, que foi também adotada pela Organização Mundial da Saúde, e que categoriza a doença em três tipos, de acordo com o aspeto clínico, distribuição e extensão da lesão. Esta classificação divide-se em: tipo I – hiperémia localizada, descrita como uma inflamação simples localizada; tipo II – eritema difuso associado ao contacto com a prótese, uma inflamação simples generalizada; tipo III – mucosa hiperémica associada a uma superfície granular, uma hiperplasia papilar inflamatória do palato (Figura 2)^{6,31-36}.



Figura 2: Classificação da EP segundo Newton: a) Tipo I, b) Tipo II; c) Tipo III.

Apesar de um grande número de estudos sugerir como causa primária da doença a origem fúngica, a etiologia que desencadeia o desenvolvimento da doença é complexa^{14,17}. Evidências científicas crescentes consideram a EP uma patologia multifatorial, associada a vários fatores etiológicos e predisponentes^{23-25,37}. Engloba i) fatores sistêmicos, como doenças autoimunes, terapêutica imunossupressora ou antimicrobiana, alterações qualitativas e quantitativas do fluxo salivar e deficiências

nutricionais; ii) fatores locais relacionados com o traumatismo da mucosa provocado por próteses desajustadas, a incorreta e escassa higiene da prótese e da cavidade oral, o uso contínuo da prótese que proporciona um ambiente favorável à proliferação de microrganismos e a hipersensibilidade ao material da prótese; e, ainda, iii) fatores infecciosos pela colonização de diversas bactérias e fungos, sendo a espécie *Candida albicans* (*C. albicans*) o agente infeccioso mais comumente encontrado^{14,22,25,33,37,38}. A *C. albicans* é um importante microrganismo comensal que se encontra no microbioma oral e a sua transição para uma condição patogénica ocorre devido à existência de fatores de predisposição no hospedeiro^{6,22,32}.

Vários estudos estabelecem uma forte associação da *C. albicans* no desenvolvimento da EP, devido à sua elevada virulência, capacidade de adesão aos tecidos orais e superfícies da prótese e habilidade para formação de biofilme^{17,22,27}. Na cavidade oral a *C. albicans* encontra-se preferencialmente organizada em biofilme. Este é uma estrutura complexa revestida por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que permite uma maior sobrevivência dos microrganismos, uma vez que tem a capacidade de limitar a penetração de agentes antimicrobianos, conferindo uma maior resistência à terapia antimicrobiana, ao sistema imunitário do hospedeiro e à higienização química e mecânica das próteses e da cavidade oral³⁹⁻⁴².

As propriedades das resinas acrílicas que constituem as próteses e dos materiais de rebasamento podem sofrer alterações ao longo do tempo, quer pela abrasão resultante da sua utilização quer pelos métodos de higienização química e mecânica, provocando o aumento da rugosidade e porosidade da superfície e criando irregularidades que facilitam a adesão da *C. albicans* e a sua organização em biofilme^{6,21,43,44}.

Devido à sua etiologia multifatorial, o tratamento da EP é complexo e deve incidir sobre a superfície protética e a mucosa oral^{22,32}. A abordagem terapêutica deve englobar em simultâneo uma boa higiene da prótese e da mucosa oral subjacente, repouso dos tecidos de suporte da prótese, eliminação de irregularidades da superfície, rebasamento de próteses desajustadas ou a sua substituição e o uso de agentes antifúngicos tópicos e/ou sistémicos, nomeadamente fluconazol, miconazol, anfotericina-B, nistatina e de antissépticos como a clorexidina (CHX)^{17,22,32,45}. Estes agentes antimicrobianos são

eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da EP, no entanto a sua maior dificuldade quando administrados topicamente é a capacidade de manter concentrações terapêuticas nos locais alvo, devido à baixa penetração no biofilme presente e à rápida eliminação pela ação da saliva e dos movimentos funcionais da musculatura oral. Assim, grande parte do fármaco é removido da cavidade oral durante a primeira hora reduzindo a sua eficácia terapêutica^{5,46-48}. Por outro lado, a administração sistêmica desmesurada de antifúngicos pode conduzir ao crescimento de resistências antimicrobianas pela *C. albicans*, em parte devido à insuficiente concentração terapêutica na superfície da prótese^{30,46}. Consequentemente, com a terapia convencional com antifúngicos tópicos e sistêmicos são frequentes as recidivas clínicas da doença e reinfeções da mucosa oral tratada^{5,17,32,45,48}.

Alguns dos maiores desafios do tratamento da EP são a necessidade de cooperação e adesão do paciente à terapêutica, a recorrência da doença com ciclos de reinfeção e assegurar a disponibilidade do fármaco na zona afetada, numa dosagem terapêutica, por um longo período de tempo^{5,22,47}.

Uma das estratégias mais recentes no tratamento da doença consiste na libertação localizada de agentes antimicrobianos, através de incorporação em materiais de rebasamento da superfície da base da prótese. Esta combinação apresenta uma alternativa aos tratamentos convencionais, melhorando a biodisponibilidade e promovendo uma libertação sustentada de fármaco, em quantidades e com eficácia terapêutica nas áreas-alvo, sem a necessidade de adesão do paciente^{5,22,26,48}. Além disso, acresce o efeito de prevenção que impede a adesão de microrganismos à base da prótese e de inibição da formação de biofilme, interferindo assim no mecanismo de infeção⁴⁹.

Estes procedimentos têm apresentado resultados *in vitro* muito promissores, que demonstram a ação dos antimicrobianos na diminuição da adesão da *C. albicans* às células epiteliais da mucosa oral e das superfícies da prótese^{17,22,47,49}. Contudo, esta estratégia apresenta algumas limitações relacionadas com a falta de controlo sobre a cinética de libertação dos fármacos. Inicialmente ocorre uma libertação em elevadas concentrações, seguida de uma diminuição exponencial, podendo assim não atingir a

concentração necessária para assegurar um efeito inibitório por longos períodos de tempo. Além disso, a sua libertação não é controlada pela presença de infecção ativa^{12,50,51}. Alguns estudos mencionam ainda que a incorporação de agentes antimicrobianos pode afetar propriedades dos materiais de rebasamento, como a resistência à tração, a sorção de água, a elasticidade, o peso, a dureza e a rugosidade^{26,45,52}.

1.2 Clorexidina

A estrutura química da CHX é composta por dois anéis clorofenólicos, que atribuem propriedades catiónicas ao composto, e dois grupos biguanidas ligados simetricamente por uma cadeia de hexametileno (Figura 3)^{53,54}. A CHX é uma base forte, praticamente insolúvel em água, sendo frequentemente utilizada em medicina dentária sob a forma de sal de digluconato, que lhe confere elevada solubilidade⁵⁴⁻⁵⁶.

A CHX é um agente antimicrobiano com um largo espectro de ação contra vários microrganismos, como bactérias, vírus e fungos^{38,53,56}. É usada com regularidade como antisséptico na cavidade oral, com comprovadas propriedades antifúngicas, antibacterianas e no combate à formação de biofilme, diminuindo a adesão da *C. albicans* nas superfícies da mucosa oral e das próteses dentárias^{47,49,53,57}. Evidências científicas têm demonstrado *in vivo* que a CHX apresenta melhor substantividade, ou seja, capacidade de permanência ativa na cavidade oral, quando comparada com outros antissépticos utilizados^{17,56,58}.

A sua atividade antimicrobiana é influenciada pela sua substantividade, que depende não só da capacidade de adsorção da CHX às diferentes superfícies, mas também de fatores intrínsecos à substância, como a concentração e o tempo de aplicação, e extrínsecos, como o pH e a temperatura da cavidade oral e a presença de prótese dentária^{53,54,58,59}. O seu mecanismo de ação é explicado pelo facto da molécula carregada positivamente ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, resultando num desequilíbrio osmótico^{56,60-62}. Em concentrações baixas apresenta ação

bacteriostática comprometendo a integridade da membrana e originando extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular. Por outro lado, a sua ação bactericida é exibida em elevadas concentrações, ocorrendo precipitação e coagulação dos constituintes citoplasmáticos, que impedem a reparação da membrana celular e originam a morte bacteriana^{54,59,60}.

Apesar do modo de ação da CHX na *C. albicans* ainda não se encontrar bem esclarecido tem sido sugerido que o mecanismo para os fungos é semelhante ao descrito anteriormente para as bactérias, ou seja, dependendo da concentração pode atuar como fungicida ou ter ação fungistática^{5,38,57,63}.

Outra das vantagens apresentadas pela CHX é a sua menor capacidade de induzir resistências quando comparada com outros agentes antimicrobianos e, conseqüentemente, menor possibilidade de recorrência da doença^{5,60}. Contudo, apresenta algumas desvantagens nomeadamente a sensação de ardor, sabor desagradável, irritação da mucosa e coloração dentária quando administrada por longos períodos de tempo, desaparecendo facilmente com o término da terapêutica. Além disso, pode ainda induzir efeitos citotóxicos em células humanas, como fibroblastos e células do ligamento periodontal, dependendo do tempo e da concentração das soluções utilizadas^{42,54}.

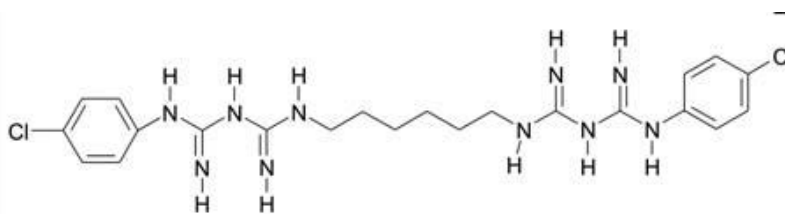


Figura 3: Estrutura química da clorexidina⁶⁴.

1.3 Objetivos do estudo

O principal objetivo deste trabalho é investigar se a veiculação de CHX através da adsorção na superfície de materiais de rebasamento pode constituir uma estratégia terapêutica eficaz para combater a EP.

Como objetivos específicos são definidos os seguintes:

- Verificar se a superfície dos materiais de rebasamento apresenta capacidade de adsorção de CHX pelo método de imersão em solução;
- Avaliar a influência da concentração das soluções e do tempo de imersão no processo de adsorção da CHX;
- Verificar o perfil de libertação da CHX;
- Determinar a manutenção da atividade antifúngica da CHX libertada contra *C. albicans*;
- Avaliar a citotoxicidade induzida em fibroblastos pela CHX libertada;
- Verificar a capacidade de recarga dos materiais após lixiviação completa.

Com a realização desta investigação, pretende-se responder às seguintes hipóteses nulas (de investigação):

H0: A quantidade de CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento não depende da concentração das soluções de imersão.

H1: A quantidade de CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento depende da concentração das soluções de imersão.

H0: A quantidade de CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento não depende do tempo de imersão nas soluções.

H1: A quantidade de CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento depende do tempo de imersão nas soluções.

H0: A atividade antifúngica da CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento não depende da concentração das soluções de imersão.

H1: A atividade antifúngica da CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento depende da concentração das soluções de imersão.

H0: A atividade antifúngica da CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento não depende do tempo de imersão nas soluções.

H1: A atividade antifúngica da CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento depende do tempo de imersão nas soluções.

H0: A citotoxicidade induzida em fibroblastos pela CHX libertada após 24 horas de contacto não depende da concentração das soluções de imersão.

H1: A citotoxicidade induzida em fibroblastos pela CHX libertada após 24 horas de contacto depende da concentração das soluções de imersão.

2. Material e métodos

2.1 Materiais

Neste estudo foram testados dois tipos de materiais de rebasamento para próteses dentárias, o Ufi Gel® SC, um material de rebasamento mole, à base de silicone de adição e o Ufi Gel® hard C, um material de rebasamento duro, à base de acrílico. Ambos são materiais autopolimerizáveis, de polimerização a frio, que podem ser utilizados em rebasamentos diretos ou indiretos e os dois foram utilizados sob a forma de cartuchos de automistura. O agente antimicrobiano usado foi a CHX, adquirida sob a forma de solução comercial de digluconato de clorexidina (Figura 4). O lote, prazo de validade e fabricante dos materiais utilizados são apresentados na Tabela I.

Tabela I: Descrição dos materiais de rebasamento e da CHX utilizados no estudo.

Material	Lote (prazo de validade)	Fabricante
Ufi Gel® SC	2052151 (11/2022)	Voco GmbH., Cuxhaven, Germany
Ufi Gel® hard C	2050263 (06/2023)	Voco GmbH., Cuxhaven, Germany
Digluconato de clorexidina 20%	093K1056	Sigma-Aldrich., Steinheim, Germany



Figura 4: Materiais utilizados no estudo. a) Ufi Gel® SC; b) Ufi Gel® hard C; e c) Digluconato de clorexidina 20%.

2.2 Preparação dos provetes

Os provetes (n=310) foram preparados conforme descrito em estudos anteriores, com pequenas modificações^{43,52}. Os materiais de rebasamento foram manipulados à temperatura ambiente e de acordo com as instruções do fabricante. Foram preparados com pistola e pontas misturadoras próprias e aplicados num molde em forma de disco com 5,5 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura, criado em placa de cera com auxílio de bisturi circular (Figura 5a). De forma a homogeneizar a rugosidade das superfícies dos provetes, os moldes foram colocados entre duas placas de vidro e sujeitos a uma pressão constante até à completa polimerização dos materiais^{21,26,43,51}.

Após a polimerização, os provetes foram separados dos moldes, analisados visualmente para garantir que não apresentavam espaços vazios e a sua superfície lateral foi cuidadosamente aparada e uniformizada com bisturi, tesoura cirúrgica e broca de polimento em baixa rotação (Figura 5b e 5c)^{26,43,50,51}.

Depois de preparados, os provetes foram colocados num banho de ultrassons (Sonorex, Bandelin) por 4 períodos de 15 minutos, desinfetados com etanol a 96% e armazenados num dessecador de sílica por 8 horas^{12,51}.

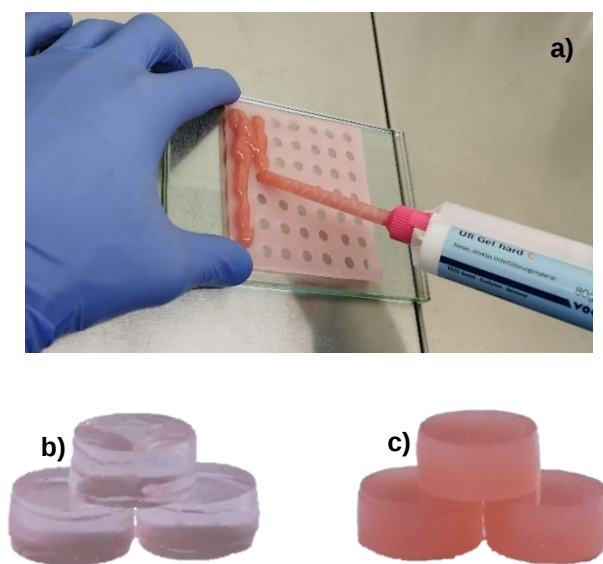


Figura 5: a) Fase do processo de confeção dos provetes. Exemplos dos provetes utilizados no estudo: b) Ufi Gel® SC e c) Ufi Gel® hard C.

2.3 Adsorção da clorexidina

A capacidade da superfície dos materiais de rebasamento adsorver CHX foi estudada através da sua imersão em 5 soluções com diferentes concentrações de CHX ao longo de 3 períodos de tempo (n=10 por condição experimental)^{12,50}.

As soluções de CHX foram preparadas de fresco, a partir de diluições da solução comercial de digluconato de clorexidina a 20%, em água ultrapura, nas concentrações de 0%, 0,2%, 1,0%, 2,5% ou 5,0% (V/V)^{60,65,66}.

Os discos foram imersos individualmente em 0,4 mL das soluções de CHX previamente preparadas (Figura 6) e colocados a incubar a 37°C sob agitação constante (40 rpm). Após os diferentes períodos de incubação (1 hora, 8 horas e 24 horas), os discos referentes a cada condição, foram retirados das soluções e transferidos para placas não-aderentes de 24 poços, devidamente identificados quanto ao tempo e à concentração da solução de imersão, e posteriormente armazenados num dessecador de sílica durante 8 horas^{12,50}.

No final, metade dos provetes de cada condição (n=5) foram utilizados para analisar a cinética de libertação da CHX e a outra metade (n=5) para testar a atividade antifúngica da CHX libertada contra *C. albicans*.

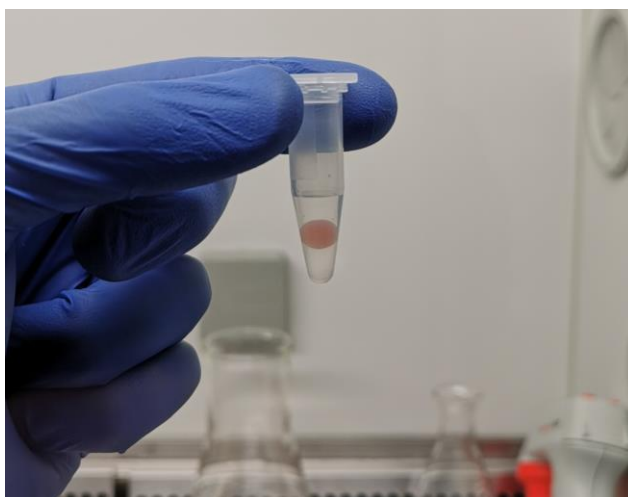


Figura 6: Provete de Ufi Gel® hard C imerso numa solução de CHX.

2.4 Liberação da clorexidina

De forma a analisar a liberação da CHX adsorvida na superfície dos materiais, os provetes de cada condição foram imersos individualmente em 1 mL de água ultrapura, em placas não-aderentes de 24 poços, e colocados a incubar a 37°C sob agitação constante (40 rpm). Para avaliar a cinética de liberação, após 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 3 horas e 24 horas de incubação, todo o conteúdo do poço foi recolhido e substituído por 1 mL de água ultrapura^{12,21,50,66}.

A quantidade de CHX que se libertou de cada provete, em cada intervalo de tempo, foi determinada através da leitura da absorvância da solução recolhida, por espectrofotometria UV, num comprimento de onda de 254 nm ($\lambda=254$ nm) (Synergy HT, BioTek). Tendo em consideração que o pico de absorvância de outros compostos libertados poderia aumentar a leitura da absorvância da CHX, a absorvância das soluções dos grupos controlo correspondentes (0%, sem CHX) foi subtraída aos grupos testados. Esse valor final de absorvância foi depois convertido em quantidade de CHX libertada (mg/L) com base numa curva de calibração previamente realizada, através da medição da absorvância de soluções de CHX de concentrações conhecidas, de 0 a 100 mg/L, preparadas em água ultrapura ($r^2=0,99$)^{12,21,50,66}.

O valor da liberação cumulativa da CHX foi determinado através da soma dos valores de CHX libertada durante os 5 períodos de tempo avaliados, para cada provete.

2.5 Microrganismos e condições de cultura

Para os estudos de atividade antifúngica foi utilizada a levedura *C. albicans* ATCC 10231, obtida da American Type Culture Collection (ATCC).

A cultura stock congelada de *C. albicans* foi reativada em caldo Sabouraud - 2% glucose (Merck) durante 24 horas a 37°C. Após esse período, a suspensão fúngica foi inoculada em placas de agar Sabouraud, e incubadas novamente durante 24 horas a 37°C. Após confirmada a pureza da cultura, 2 colónias da levedura foram inoculadas em 20 mL de caldo Sabouraud e incubadas durante a noite a 37°C, sob agitação constante (100 rpm), para permitir o crescimento da levedura^{42,46,47}.

Posteriormente, a suspensão de *C. albicans* foi ajustada em espectrofotômetro, a 600 nm (Jenway 6300), para uma densidade de 1×10^8 unidades formadoras de colônias (CFU)/mL, com base numa curva de calibração previamente realizada^{42,55}.

2.6 Concentração mínima inibitória da clorexidina para *C. albicans*

A concentração mínima inibitória (MIC) da CHX para *C. albicans* foi determinada através do método de microdiluição em placa^{48,60,63}.

Inicialmente, foi preparada uma solução de CHX de concentração 2000 mg/L através da diluição da solução comercial de digluconato de clorexidina a 20%. Em seguida, partindo dessa solução, foram realizadas diluições em série para se obterem 12 soluções de CHX de concentração conhecida dentro do intervalo de 2000 a 1 mg/L.

Posteriormente, numa microplaca de 96 poços foram colocados 50 µL da suspensão de *C. albicans* a 1×10^6 CFU/mL, previamente diluída, e 50 µL de cada uma das 12 concentrações de CHX a ser testadas, originando as concentrações: 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 31, 63, 125, 250, 500, 1000 mg/L. Como controlos incubou-se: (i) a levedura com 50 µL de água ultrapura, para descartar o possível efeito fungicida da água (solvente utilizado nas diluições da CHX); e (ii) a levedura com 50 µL de meio de cultura, para simular as condições ideais de crescimento. As microplacas foram incubadas a 37°C, sob agitação constante (100 rpm), durante 24 horas.

Após o período de incubação avaliaram-se visualmente as microplacas e o MIC foi determinado como a concentração mais baixa de CHX na qual não se verificou a presença de turbidez nos poços (ausência de crescimento).

Adicionalmente determinou-se a concentração mínima bactericida (MBC). Para isso inculou-se em placas de agar Sabouraud o conteúdo dos poços relativos ao MIC e às concentrações mais elevadas. As placas de cultura foram depois incubadas a 37°C durante 24 horas. Após este período avaliaram-se as placas e o MBC foi determinado como a concentração mais baixa de CHX que impediu o crescimento da levedura nas placas de agar Sabouraud^{42,67}.

2.7 Atividade antifúngica da clorexidina libertada

Com o intuito de avaliar se a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento mantinha a sua atividade antifúngica contra *C. albicans* foi realizado o teste de difusão em agar^{21,28,50,55}.

Para realizar este teste preparam-se 40 placas de agar Sabouraud e utilizaram-se 5 provetes de cada condição de imersão e 5 provetes sem tratamento.

O agar Sabouraud foi preparado e esterilizado de acordo com as normas do fabricante. Após a sua preparação, foram distribuídos 20 mL por cada placa de Petri estéril de poliestireno (90x15 mm), colocadas sobre uma superfície plana, para se obterem placas idênticas com 4 mm de espessura média⁵⁵.

As placas de agar Sabouraud foram inoculadas com uma suspensão de *C. albicans* a 1×10^8 CFU/mL, previamente preparada, com o auxílio de uma zaragatoa estéril, para se espalhar de forma uniforme na superfície do agar e se conseguir um “tapete” consistente/homogêneo. Em seguida, os discos foram distribuídos pela superfície de cada placa e estas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

Após esse período os diâmetros das zonas de inibição foram medidos utilizando uma régua calibrada e ao valor obtido foi descontado o diâmetro dos provetes.

2.8 Recarga dos materiais

De forma a avaliar a capacidade de recarga dos materiais, os provetes provenientes do ensaio de libertação (secção 2.4) foram colocados num banho de ultrassons, em água ultrapura, por 4 períodos de 15 minutos e armazenados num dessecador de sílica por 8 horas^{11,12,50}.

Posteriormente, após secagem, os provetes foram imersos em soluções de CHX de 1% e 2,5%, durante 8 horas. Em seguida, foram realizados os procedimentos de libertação e de atividade antifúngica da CHX libertada pelos materiais recarregados, conforme descrito anteriormente (secções 2.4 e 2.7).

2.9 Atividade da clorexidina na eliminação do biofilme de *C. albicans*

Para avaliar a capacidade da CHX eliminar um biofilme de *C. albicans*, colocaram-se inicialmente 100 µL da suspensão de *C. albicans* a 1×10^8 CFU/mL, previamente preparada, em microplacas de 96 poços que foram depois incubadas a 37°C durante 24 horas. Após a formação do biofilme, o meio foi aspirado e os poços foram lavados uma vez com 100 µL de solução salina 0,9%, para remover leveduras não aderentes ou fracamente aderidas. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de caldo Sabouraud e 50 µL de cada uma das 7 concentrações de CHX a ser testadas, originando as concentrações de 16, 31, 63, 125, 250, 500, 1000 mg/L. Como controlos incubou-se o biofilme com (i) 50 µL de água ultrapura e 50 µL de caldo Sabouraud, para descartar o possível efeito fungicida da água e (ii) com 100 µL de caldo Sabouraud, para simular as condições ideais de crescimento da levedura. As microplacas foram novamente incubadas a 37°C, sob agitação constante (100 rpm), durante 24 horas^{60,67}.

Para determinar o efeito anti-biofilme das soluções de CHX, avaliou-se a atividade metabólica das leveduras pelo método da resazurina e o número de células cultiváveis pela quantificação das CFU/mL⁶⁰.

No método da resazurina, as leveduras que se encontram metabolicamente ativas reduzem o composto resazurina, de cor azul e não fluorescente, a resorufina, de cor rosa e fluorescente. Para esta análise, o biofilme foi lavado uma vez com 100 µL de solução salina 0,9% e, de seguida, adicionou-se caldo Sabouraud com 10% de resazurina (0,1 mg/mL, Sigma-Aldrich). Após 1 hora a 37°C efetuou-se a leitura da fluorescência nos comprimentos de onda de 530 nm e 590 nm para excitação e emissão, respetivamente, num leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek)⁶⁰.

Para a quantificação das CFU, o biofilme foi lavado inicialmente com 100 µL de solução salina 0,9%, e depois adicionaram-se 100 µL de solução salina 0,9% para se efetuar a raspagem do poço e dispersar o biofilme que se encontrava aderido ao fundo do poço. De seguida, efetuaram-se diluições decimais e procedeu-se ao respetivo plaqueamento em placas de agar Sabouraud. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 horas, após o qual se determinou as CFU/mL⁶⁰.

2.10 Citotoxicidade da clorexidina libertada

Avaliou-se a citotoxicidade da CHX libertada nos primeiros 5 minutos pelos materiais que estiveram imersos em soluções de CHX de 1% e 2,5% por 8 horas, em fibroblastos, de acordo com a norma ISO 10993-5:2009, *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*⁶⁸.

Fibroblastos L929 (NCTC clone 929, ATCC) foram mantidos em meio de cultura α -Miniuml Essential Medium, (α -MEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 0,25 μ g/mL de anfotericina B (todos os reagentes da Gibco), a 37°C numa atmosfera húmida com 5% CO₂. Com uma confluência de aproximadamente 80%, a camada de células aderente foi lavada duas vezes com uma solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS) e incubada por 5 minutos com uma solução de TrypLE™ Express (Gibco) a 37°C, para destacar as células aderidas. A suspensão celular foi depois recolhida e ajustada à densidade celular de 1×10^5 células/mL^{60,63}.

De seguida, adicionaram-se 100 μ L dessa suspensão celular aos poços de placas de cultura de 96 poços e colocaram-se a incubar a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% CO₂, durante 24 horas. Após a incubação, o meio foi removido e a camada celular aderida foi exposta às soluções de CHX na proporção 75:25 (CHX:Meio de cultura). Como controlo as células foram incubadas apenas com meio de cultura^{60,63}.

As culturas foram incubadas por 1 hora, 3 horas e 24 horas após as quais se avaliou a atividade metabólica das células pelo método de MTT. Este método baseia-se na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) pelas células viáveis num precipitado insolúvel de cor púrpura, formazan, que se acumula no interior das células, sendo necessária a sua solubilização para posterior quantificação. Após o período de exposição das células à CHX, o meio foi removido e adicionou-se a cada poço 100 μ L de MTT (1 mg/mL, Sigma-Aldrich). Após 2 horas a 37°C, a solução de MTT foi removida e a morfologia e densidade celular foram registadas com um microscópio invertido com contraste de fase (Primovert, Zeiss) (Figura 7). No final, os cristais de formazan foram solubilizados com isopropanol (Merck) durante 15 min e procedeu-se à leitura da absorbância a 550 nm num leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek). Os

valores de viabilidade celular estão expressos em percentagem relativamente à absorvância determinada nas células controlo^{63,69}.



Figura 7: Registo da morfologia e densidade celular com microscópio invertido com contraste de fase.

2.11 Análise estatística

As análises experimentais foram realizadas com 5 réplicas de cada material. Os resultados obtidos são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. A análise estatística foi realizada com o programa IBM® SPSS® Statistics 26. A comparação de duas condições experimentais foi realizada pelo teste-t e a comparação entre vários grupos foi realizada pela análise de variância unidirecional (One-way ANOVA). Foram validados os pressupostos de Normalidade e Homogeneidade de variâncias através dos testes de Shapiro-Wilk e teste de Bartlett, respetivamente. Quando os pressupostos não se verificaram, optou-se pela alternativa não paramétrica teste de Kruskal Wallis. As comparações múltiplas foram realizadas pelo teste *post hoc* Tukey. Para todas as análises assumiu-se o valor $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1 Adsorção e cinética de liberação da clorexidina

Após a análise da cinética de liberação, verificou-se que, para todas as condições avaliadas, 90% da CHX adsorvida pela superfície dos materiais libertou-se nos primeiros 5 minutos de imersão em água e cerca de 95% nos primeiros 15 minutos. Ao fim de 30 minutos já não se verificava liberação em nenhuma condição estudada (Figura 8).

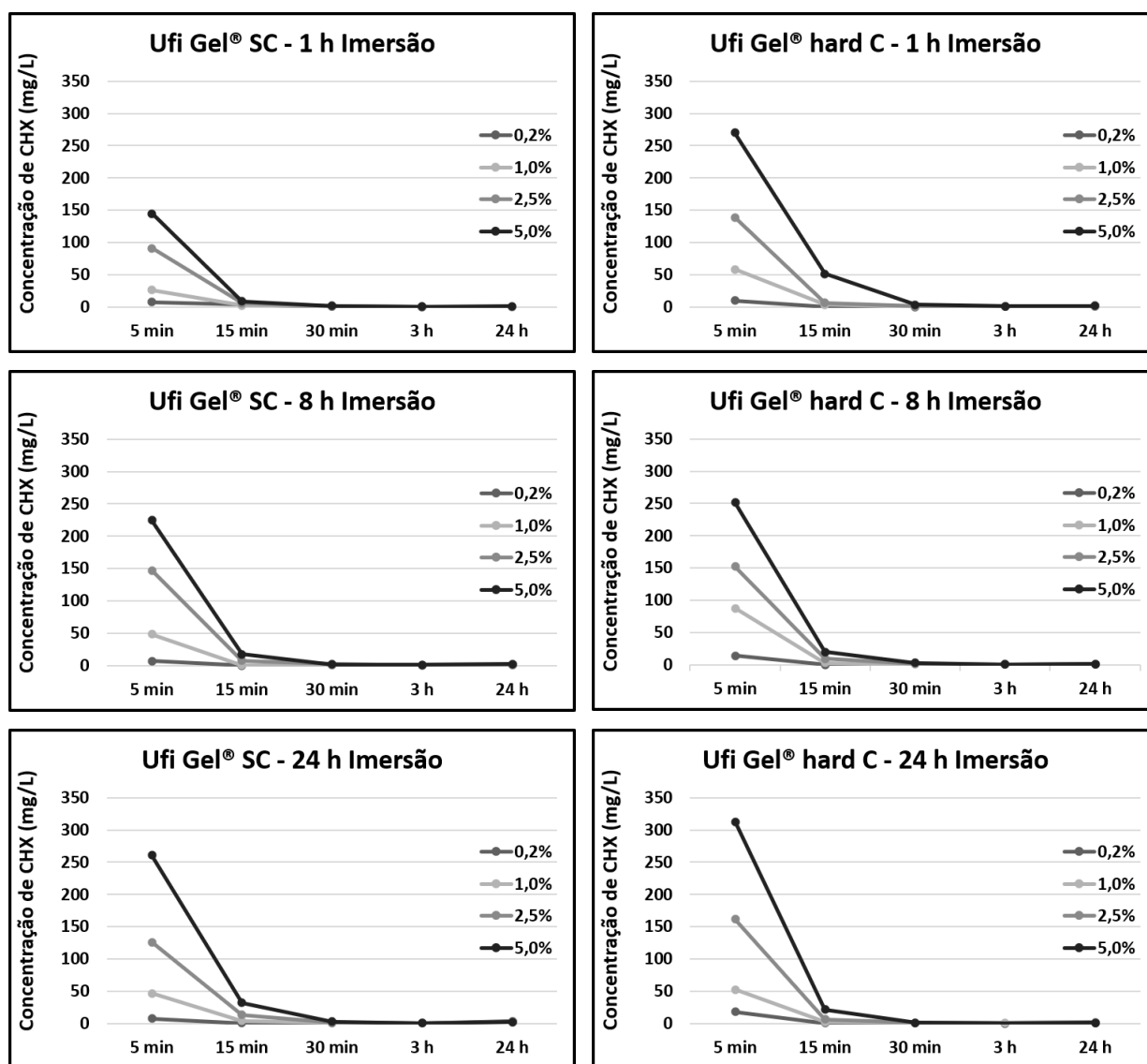


Figura 8: Cinética de liberação da CHX adsorvida pela superfície dos materiais Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%).

Com base na cinética de liberação previamente apresentada, determinou-se indiretamente a capacidade da superfície dos diferentes materiais de rebasamento adsorver CHX, através da soma de toda a CHX libertada pelo material ao longo do tempo, *i.e.*, liberação cumulativa (Figura 9 e 10).

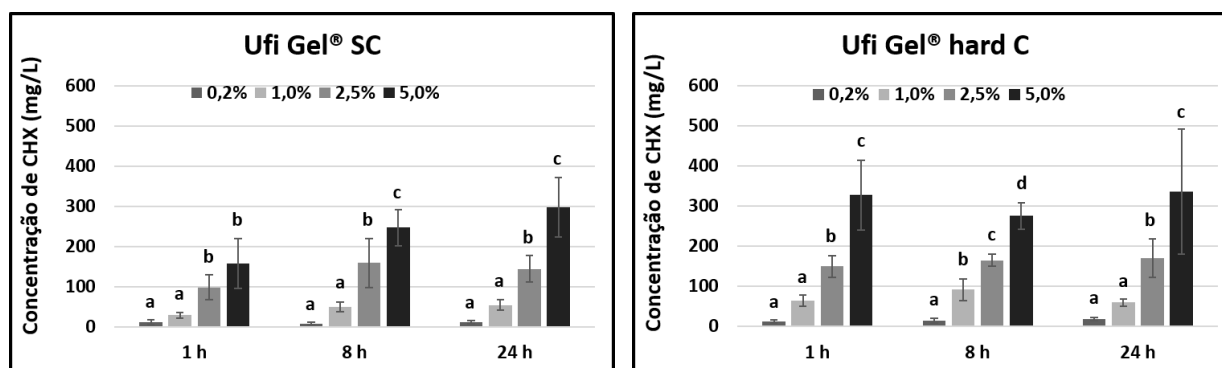


Figura 9: Liberação cumulativa da CHX adsorvida pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações das soluções de imersão para cada tempo de imersão ($p < 0,05$).

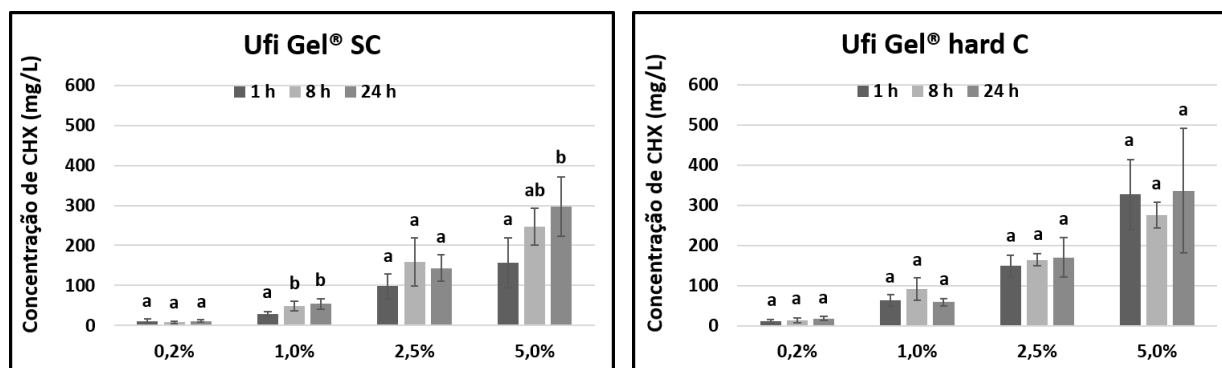


Figura 10: Liberação cumulativa da CHX adsorvida pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tempos de imersão para cada concentração das soluções de imersão ($p < 0,05$).

Em ambos os materiais, a quantidade de CHX libertada pela sua superfície aumentou com o aumento da concentração das soluções de imersão, sendo esta significativamente maior nas condições de imersão com concentração mais elevada (2,5% e 5%) em relação às condições mais baixas (0,2% e 1%). Além disso, a quantidade de CHX libertada foi significativamente mais elevada na condição de 5% em relação à condição 2,5%, exceto para Ufi Gel® SC após 1h de imersão ($p < 0,05$) (Figura 9).

Por outro lado, o aumento do tempo de imersão nas soluções não mostrou ser um fator determinante para o aumento de adsorção da CHX. Apenas o material Ufi Gel® SC, para as concentrações 1% e 5%, apresentou uma tendência de aumento de CHX libertada com o aumento do tempo de imersão, sendo esta significativamente maior para as 24 horas do que para 1 hora de imersão ($p < 0,05$) (Figura 10).

Os resultados obtidos na libertação de CHX foram ligeiramente superiores no Ufi Gel® hard C quando comparados com o Ufi Gel® SC, nas mesmas condições experimentais, nomeadamente nas condições de 5% de CHX, onde Ufi Gel® hard C apresenta concentrações de 327 mg/L, 275 mg/L e 336 mg/L para 1 hora, 8 horas e 24 horas, respetivamente.

3.2 Atividade antifúngica da clorexidina para *C. albicans*

Inicialmente, determinou-se a atividade antifúngica da CHX para *C. albicans* em suspensão (população planctónica). A MIC determinada foi de 16 mg/L, enquanto a MBC foi de 63 mg/L (Tabela II). Estes valores encontram-se de acordo com literatura consultada⁶⁷.

Tabela II: MIC e MBC da CHX determinadas para *C. albicans*.

	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)
CHX	16	63

Tendo em consideração que os microrganismos apresentam maior resistência aos fármacos quando organizados em biofilme (população séssil), determinou-se a concentração de CHX necessária para eliminar um biofilme de 24 horas de *C. albicans*. O efeito anti-biofilme das soluções de CHX foi determinado através da análise da atividade metabólica das leveduras pelo método da resazurina e o número de células cultiváveis pela quantificação das CFU/mL (Figura 11).

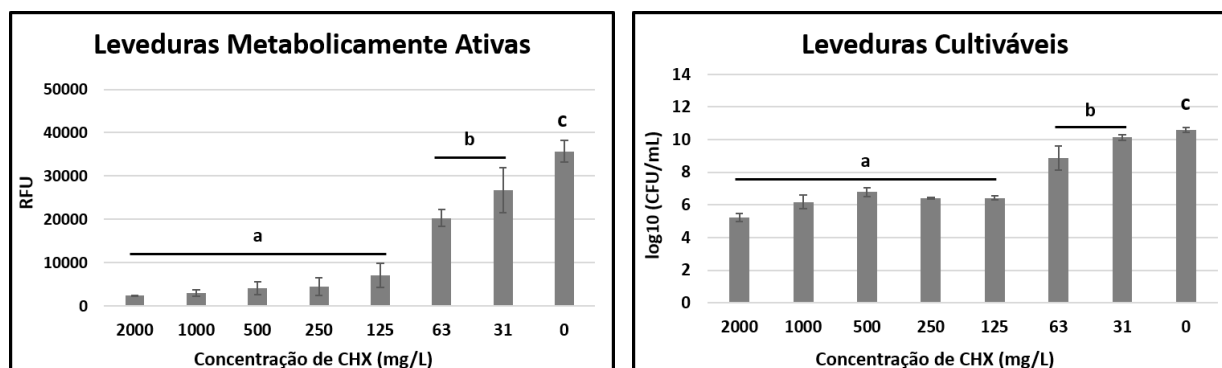


Figura 11: Avaliação do efeito de soluções de CHX na eliminação de um biofilme de 24 horas de *C. albicans*, através da análise da atividade metabólica das leveduras pelo método da resazurina e do número de células cultiváveis pela quantificação das CFU/mL. RFU - unidades relativas de fluorescência. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas entre as condições ($p < 0,05$).

Em ambos os métodos utilizados verificou-se que todas as concentrações de CHX avaliadas permitiram uma eliminação significativa do biofilme de *C. albicans*. De realçar que para concentrações superiores a 63 mg/L observou-se uma redução superior a 80% na atividade metabólica das leveduras no biofilme e superior a 4 logs nas leveduras cultiváveis ($p < 0,05$) (Figura 11).

3.3 Atividade antifúngica da clorexidina libertada

Para avaliar se a CHX inicialmente adsorvida pela superfície dos materiais mantinha a sua atividade antifúngica contra *C. albicans* ao ser libertada, foi realizado o teste de difusão em agar. Após as 24 horas de incubação, a existência de um halo de inibição em volta dos provetes indicava a ausência de crescimento de *C. albicans* e demonstrava que a CHX mantinha a sua capacidade antifúngica (Figura 12, 13 e 14).

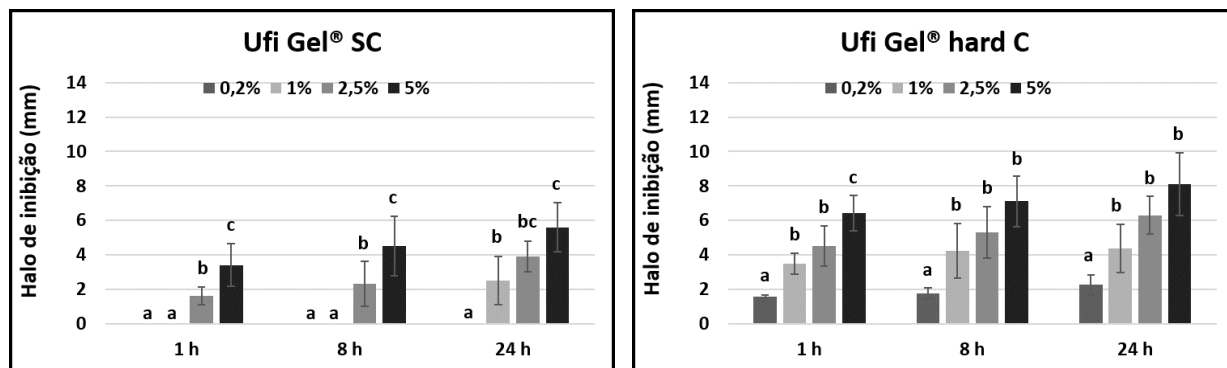


Figura 12: Halos de inibição determinados para a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2.5% e 5%). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações das soluções de imersão para cada tempo de imersão ($p < 0,05$).

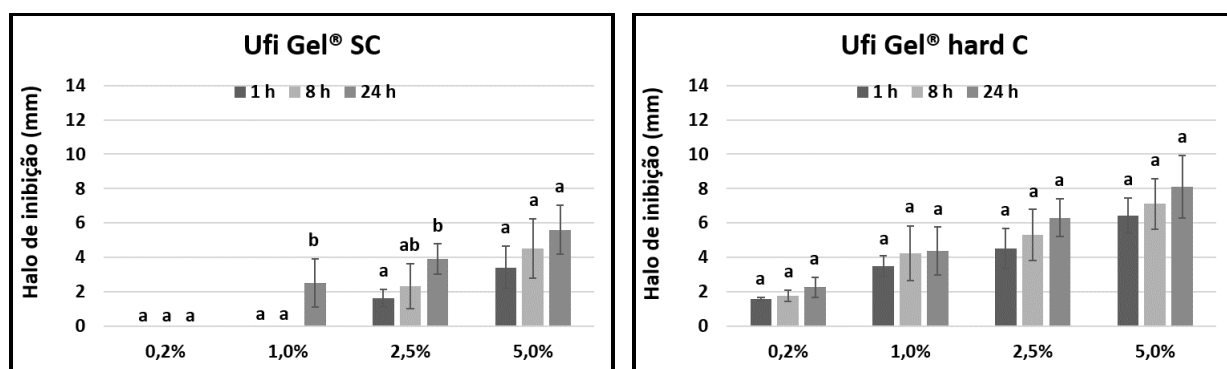


Figura 13: Halos de inibição determinados para a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2.5% e 5%). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tempos de imersão para cada concentração das soluções de imersão ($p < 0,05$).

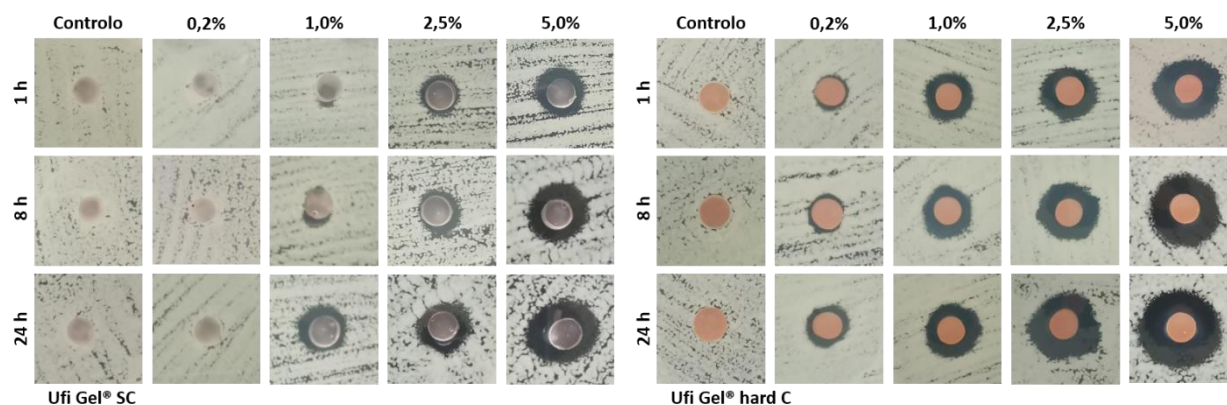


Figura 14: Representação fotográfica dos halos de inibição determinados para a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C após 1, 8 e 24 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (0.2%, 1%, 2,5% e 5%).

Em ambos os materiais ocorre um aumento do diâmetro dos halos com o aumento da concentração das soluções de imersão, assim como uma tendência de aumento de inibição com o aumento do tempo de imersão nessas soluções (Figura 14).

No caso do Ufi Gel® SC, não se verificou a formação de halo de inibição com a imersão em soluções de concentração 0,2% de CHX, enquanto nas soluções de concentração 1% apenas ocorreu formação de halo de inibição na imersão por 24 horas (Figura 14). Nas condições de imersão em soluções de concentração mais elevadas (2,5% e 5%) ocorreu sempre a formação de halos de inibição, sendo estes significativamente maiores na condição de 5% de CHX do que nas duas concentrações mais baixas (0,2% e 1%) ($p < 0,05$) (Figura 12). O diâmetro dos halos aumentou com o tempo de imersão, contudo apenas Ufi Gel® SC mostrou diferenças estatisticamente significativas entre 1 hora e 24 horas de imersão em 2,5% de CHX ($p < 0,05$) (Figura 13).

Por outro lado, no Ufi Gel® hard C verificou-se a formação de halo de inibição em todas as condições estudadas, não existindo diferenças estatisticamente significativas com o aumento do tempo de imersão ($p < 0,05$) (Figura 13). No entanto, as concentrações mais elevadas (1%, 2,5% e 5%) apresentaram halos de inibição significativamente maiores quando comparadas com a menor concentração (0,2%) ($p < 0,05$) (Figura 12).

No geral, o material Ufi Gel® hard C apresentou halos de inibição com maior diâmetro do que o material Ufi Gel® SC em todas as condições testadas (Figura 14).

3.4 Recarga dos materiais

Após o primeiro ciclo de adsorção/libertação foi necessário avaliar se as características da superfície dos materiais de rebasamento mantinham o mesmo perfil de adsorção/libertação previamente determinado.

Baseado nos resultados da atividade antifúngica das soluções de CHX (secção 3.2 e 3.3) e nos valores de citotoxicidade da CHX identificados na literatura, foram selecionadas as seguintes condições: imersão em soluções de 1% e 2,5% de CHX durante 8 horas, para avaliar a capacidade de recarga dos materiais, bem como a manutenção da atividade antifúngica da CHX libertada (Figura 15).

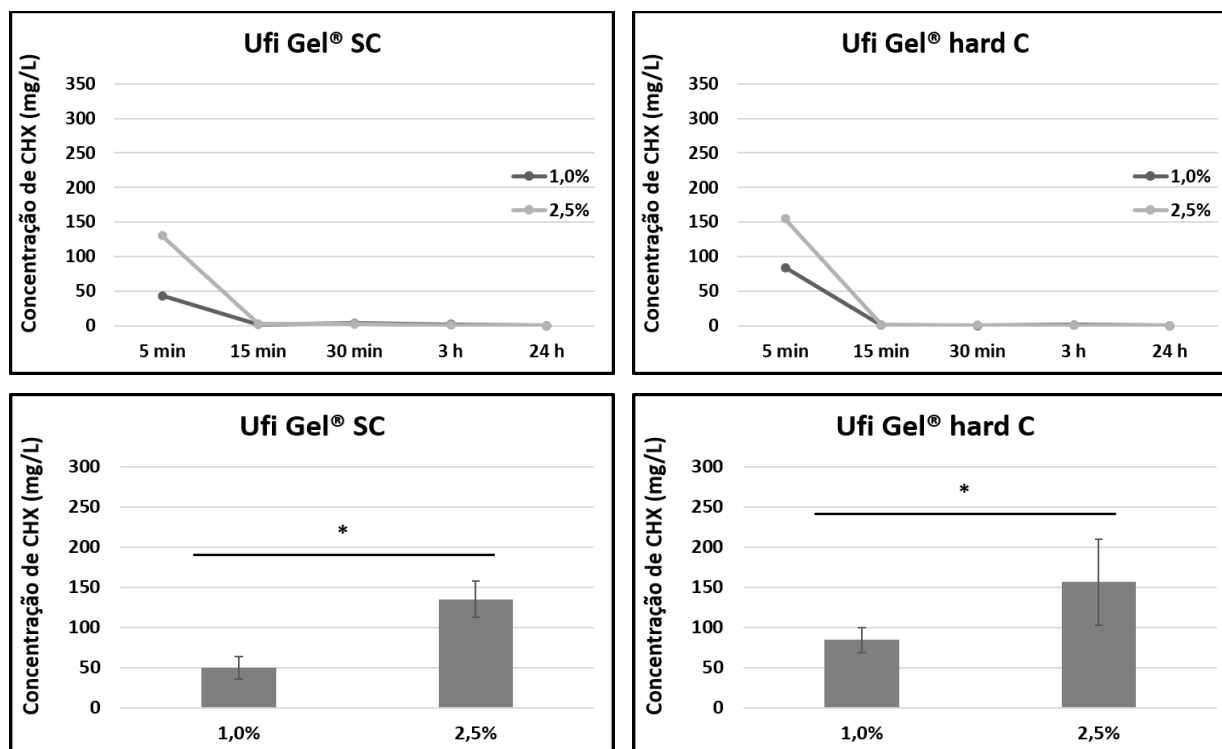


Figura 15: Cinética de libertação e libertação cumulativa da CHX adsorvida pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C recarregados, após 8 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (1% e 2,5%). * Diferenças estatisticamente significativas entre as condições ($p < 0,05$).

Quando recarregados, ambos os materiais mostraram idêntica cinética de libertação, tendo sido libertada mais de 90% de toda a CHX ao fim de 5 minutos de incubação. Pela

análise dos valores da libertação cumulativa verificou-se que a concentração da CHX libertada é significativamente maior para os materiais imersos em soluções de 2,5% de CHX ($p<0,05$) (135 mg/L e 156 mg/L para Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C, respectivamente) e que o material Ufi Gel® hard C apresenta valores ligeiramente superiores em ambas as condições avaliadas (84 mg/L e 156 mg/L para as soluções de 1% e 2,5%, respectivamente) (Figura 15).

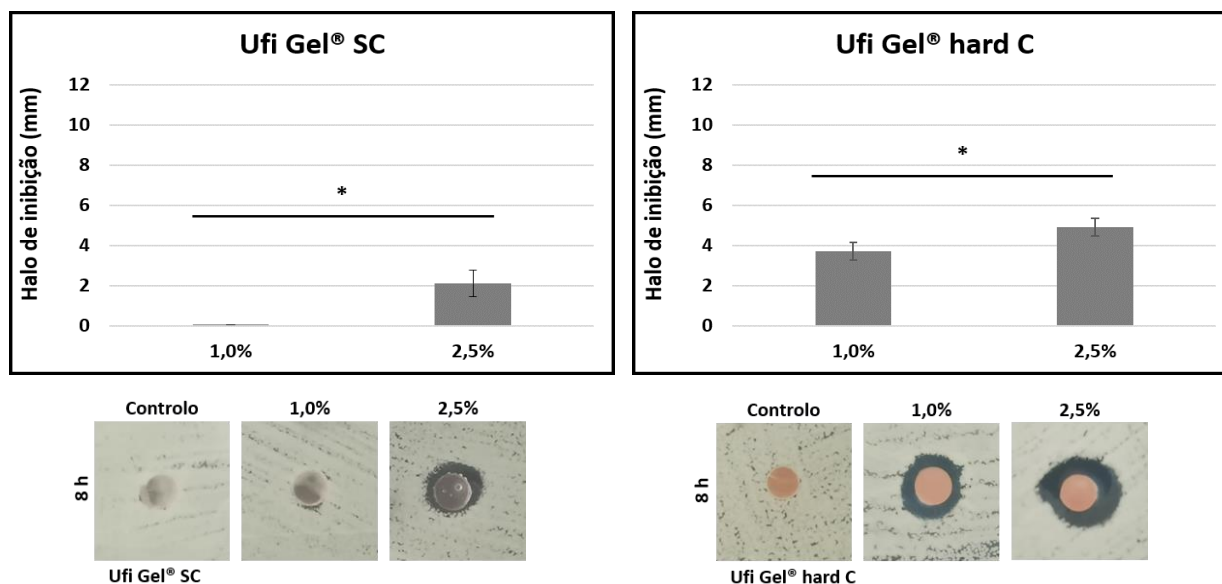


Figura 16: Halos de inibição determinados para a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C recarregados, após 8 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (1% e 2,5%). * Diferenças estatisticamente significativas entre as condições ($p<0,05$). Representação fotográfica dos resultados obtidos em cada condição experimental.

Em ambos os materiais, após recarga, verificou-se um aumento do diâmetro dos halos com o aumento da concentração das soluções de imersão, sendo os halos de inibição significativamente maiores na condição de 2,5% de CHX ($p<0,05$) e para o material Ufi Gel® hard C (Figura 16).

3.5 Citotoxicidade da clorexidina libertada

Para além da atividade antifúngica, foi importante avaliar a citotoxicidade da CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento.

Os resultados obtidos foram semelhantes para os 2 materiais, tendo-se verificado a mesma tendência de aumento da viabilidade celular ao longo dos 3 tempos de contacto avaliados. Como esperado, a condição de 1% de CHX apresenta ligeiramente maior viabilidade celular do que a condição de 2,5%, sem diferenças estatisticamente significativas após 3 horas de exposição ($p < 0,05$) (Figura 17).

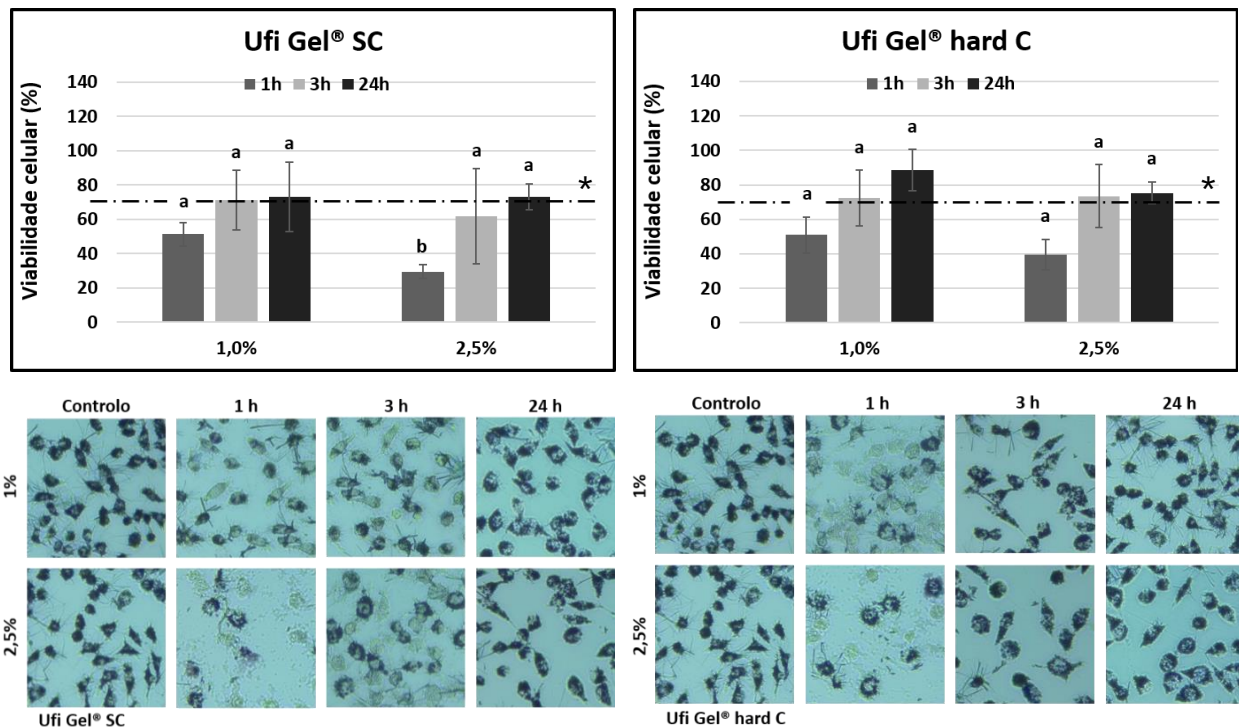


Figura 17: Viabilidade celular dos fibroblastos após 1 h, 3 h e 24 h de contacto com a CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C, após 8 horas de imersão em diferentes soluções de CHX (1% e 2,5%). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações para o mesmo tempo de estudo ($p < 0,05$). * Condição sem potencial citotóxico de acordo com ISO 10993-5 (viabilidade celular $> 70\%$). Representação microscópica das células após metabolização do MTT, para as várias condições avaliadas.

Inicialmente, após a primeira hora de contacto, verificou-se, para ambos os materiais, uma diminuição acentuada na viabilidade celular, sendo esta, no caso do Ufi Gel® SC, significativamente maior para a concentração 2,5% relativamente à concentração 1% ($p < 0,05$) (Figura 17). Contudo, após 3 horas de contacto observou-se um aumento da viabilidade celular para todas as condições avaliadas, para valores próximos de 70%. Após as 24 horas de contacto, a viabilidade mantém-se ligeiramente acima dos 70%, nos dois materiais, sem diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações ($p < 0,05$) (Figura 17). Considera-se um material sem potencial citotóxico aquele que apresenta uma viabilidade celular acima de 70%, de acordo com a ISO 10993-5⁶⁸.

Comparativamente, o material Ufi Gel® hard C apresentou a maior percentagem de viabilidade celular ao fim de 24 horas, para a condição de 1% CHX (cerca de 90%) (Figura 17).

4. Discussão

A EP é um processo inflamatório da mucosa subjacente à prótese dentária removível e é a patologia com maior prevalência em utilizadores de prótese. Apesar da sua etiologia multifatorial, evidências científicas sugerem uma forte associação entre EP e *C. albicans*^{24,26}.

A abordagem terapêutica nestes casos é complexa e deve incidir sobre a superfície protética e a mucosa oral, quer ao nível da higiene e readaptação da prótese aos tecidos, quer na utilização de antimicrobianos tópicos e sistémicos^{22,32,70}.

Uma das principais dificuldades para o sucesso da erradicação das infeções fúngicas na cavidade oral é assegurar a biodisponibilidade do fármaco na zona afetada, na dose e pelo tempo terapêutico adequado, dada a rápida eliminação ou diluição dos medicamentos aplicados topicamente na mucosa devido ao normal funcionamento do aparelho estomatognático (*i.e.*, ação da saliva, língua e músculos mastigatórios)^{5,46}.

Nesse contexto, têm sido estudadas algumas alternativas ao tratamento convencional, com o objetivo de aumentar o tempo de contacto entre os antimicrobianos tópicos e as áreas-alvo, nomeadamente a utilização de colutórios, a aplicação de formulações em gel e mais recentemente a veiculação de antimicrobianos por incorporação em materiais de rebasamento na base da prótese, apresentando resultados *in vitro* promissores^{11,30,47,50}.

Neste estudo foi avaliada uma nova abordagem, que consiste na possibilidade de veicular um agente antimicrobiano pela sua adsorção na superfície de materiais de rebasamento.

Esta opção terapêutica baseia-se no rebasamento da base da prótese, para se obter uma correta adaptação da mesma aos tecidos de suporte, seguida de uma imersão diária da base protética rebasada numa solução antimicrobiana de concentração conhecida, para permitir que as moléculas do agente antimicrobiano se liguem à superfície dos materiais de rebasamento utilizados. Após essa adsorção, a prótese é colocada em boca e o fármaco é então veiculado para uma fina película de saliva, que ocupa toda a interface base da prótese – mucosa de suporte⁷¹, assegurando dessa forma o contacto

íntimo entre o agente antimicrobiano e toda a mucosa afetada. Fatores responsáveis pela retenção das próteses, como a correta adaptação da base da prótese aos tecidos de suporte, a ação das forças de tensão superficial e o selamento periférico dos bordos da prótese, são importantes para impedir o deslocamento da prótese⁷². Por outro lado, asseguram também um microambiente restrito com reduzidas trocas salivares^{30,73}, o que permite manter o agente antimicrobiano veiculado em contacto com os tecidos afetados por um maior período de tempo, estando protegido da ação da língua e dos músculos da mastigação.

O fármaco selecionado para este trabalho experimental foi a CHX, uma vez que se trata de um agente antimicrobiano com largo espectro de ação, muito utilizado como antisséptico na cavidade oral, que apresenta maior substantividade e menor capacidade de induzir resistências antimicrobianas quando comparado com outros agentes^{5,53}. Além disso, diversos estudos comprovam a sua capacidade de adsorção/libertação à superfície de vários materiais com aplicação médico-dentária, mantendo a sua capacidade antimicrobiana, nomeadamente estudos em titânio^{65,74}, hidroxiapatite sintética^{60,61}, placas de dentina⁷⁵, adesivos ortodônticos⁶⁶ e em materiais de prótese com enxertos de monómero N-vinil-2-pirrolidinona¹² ou de ácido metacrílico⁵⁰ na sua constituição.

Neste estudo, verificou-se que a superfície dos dois materiais de rebasamento tem capacidade para veicular, por adsorção, uma quantidade significativa de CHX, que depois de libertada mantém a sua atividade antifúngica contra *C. albicans*.

Analisando a cinética de libertação da CHX inicialmente adsorvida, verifica-se que comparativamente a outros estudos, a CHX libertou-se de forma muito mais rápida, cerca de 90% nos primeiros 5 minutos e mais de 95% após 15 minutos. Estes resultados são diferentes dos anteriormente obtidos num estudo da adsorção de CHX na superfície de outros biomateriais^{12,50,60} e diferentes dos observados aquando da sua incorporação em materiais de rebasamento ou em resinas acrílicas usadas na confeção de próteses, onde se verificou uma libertação ao longo de vários dias ou até semanas^{21,47,52}.

Apesar da rápida libertação da CHX, esta vai rapidamente saturar a fina película salivar restrita na interface base protética-mucosa, ocorrendo assim uma bioacumulação

no local onde depois, através da sua substantividade e tropismo pelas células, se vai ligar aos microrganismos e exercer a sua atividade antimicrobiana.

Nos ensaios realizados verificou-se que quanto maior a concentração das soluções de imersão, significativamente maior a quantidade de CHX libertada pela superfície dos materiais e significativamente maior a atividade antifúngica contra *C. albicans* ($p < 0,05$). Estes resultados estão de acordo com diversos estudos que avaliaram a capacidade de adsorção da CHX pela superfície de outros materiais com aplicação médico-dentária, como o titânio⁶⁵ ou a hidroxiapatite^{60,61}. Do mesmo modo, os resultados demonstram um comportamento semelhante ao verificado aquando da incorporação de CHX em materiais de rebasamento ou em resinas acrílicas, onde quanto maior a quantidade de CHX incorporada, maior a sua libertação e maior a sua eficácia contra *C. albicans*^{21,76-79}.

Tendo em consideração os resultados obtidos, é possível rejeitar a primeira e a terceira hipóteses nulas, pois afirmam que a quantidade de CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento não depende da concentração das soluções de imersão (1ª H0) e que a atividade antifúngica da CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento não depende da concentração das soluções de imersão (3ª H0).

Por outro lado, embora o aumento do tempo de imersão dos materiais de rebasamento nas soluções de imersão tenha demonstrado não ser um fator determinante, este apresentou diferenças significativas na quantidade de CHX libertada pelos materiais e na atividade antifúngica contra *C. albicans* ($p < 0,05$) em algumas condições. Dessa forma, são rejeitadas as hipóteses nulas que referem, respetivamente, que a quantidade de CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento não depende do tempo de imersão nas soluções (2ª H0) e que a atividade antifúngica da CHX libertada pela superfície dos materiais de rebasamento não depende do tempo de imersão nas soluções (4ª H0).

Através da imersão de ambos os materiais nas soluções de concentrações mais altas (1%, 2,5% e 5%), e independentemente do tempo de imersão, foi possível veicular quantidades de CHX superiores ao MIC para a estirpe de *C. albicans* testada (*i.e.*, 16 mg/L), minimizando o risco de desenvolvimento de resistências e impedindo recidivas clínicas da doença, uma das maiores dificuldades encontradas no tratamento desta

patologia. Por outro lado, sabendo que na EP os microrganismos se apresentam maioritariamente organizados sob a forma de biofilme e que dessa forma apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos, verificou-se que a CHX deve estar presente em concentrações superiores a 63 mg/L para reduzir em cerca de 80% um biofilme de *C. albicans*.

Com base nos valores de atividade antimicrobiana obtidos e nos valores de citotoxicidade consultados na literatura para a CHX⁶², a capacidade de recarga dos materiais e avaliação da citotoxicidade induzida pela CHX veiculada foi realizada na condição de 8 horas de imersão nas soluções de 1% e 2,5%, para ambos os materiais.

Quando recarregados, os materiais de rebasamento mostraram resultados de adsorção, cinética de libertação da CHX e de atividade antifúngica semelhantes aos obtidos inicialmente, o que significa que estes materiais possuem capacidade de recarga após lixiviação completa, podendo assim ser recarregados diariamente. Esta capacidade dos materiais permite por um lado ter um melhor controlo sobre a quantidade de CHX veiculada todos os dias para os locais afetados e permite também, se necessário, uma atuação por longos períodos de tempo, enquanto existir infeção ativa na cavidade oral.

Diversos estudos apontam que o uso prolongado no tempo e a repetida higienização com soluções desinfetantes, como a CHX, pode afetar negativamente algumas das propriedades físicas dos materiais de rebasamento, como a rugosidade e a porosidade, problema semelhante ao verificado pelo método da incorporação^{22,80,81}. Apesar desses parâmetros não terem sido avaliados, essa limitação não inviabiliza esta opção de tratamento, pois como se trata de um material provisório, este pode ser rápida e confortavelmente substituído nas consultas de controlo médico-dentário sempre que necessário, com a enorme vantagem do paciente não ficar privado da sua prótese.

Uma vez que a CHX veiculada fica restrita na interface prótese-mucosa, zona sujeita a reduzidas trocas salivares, e dada a sua substantividade e tropismo para as células, avaliou-se a citotoxicidade da CHX libertada com fibroblastos durante o período de 1 hora, 3 horas e 24 horas. Os resultados mostraram que o tipo de material não foi relevante para a citotoxicidade induzida, pois ambos apresentaram comportamento semelhante. Por outro lado, a variação da concentração das soluções de imersão,

apresentou uma relação dose-efeito com a percentagem de viabilidade celular, na qual o aumento da concentração da CHX provoca uma diminuição na viabilidade celular, o que está de acordo com vários estudos consultados^{60,74,82}.

Durante o ensaio verificou-se que na primeira hora de contacto, correspondente na prática a uma exposição aguda à CHX, o metabolismo celular dos fibroblastos reduziu para cerca de 50%, com as soluções de lixiviação de 1% de CHX, e para uma média de 35%, com as soluções resultantes da CHX a 2,5% em comparação com os resultados do grupo controlo, revelando assim um comportamento inicial moderadamente citotóxico. No entanto, para ambas as concentrações, observou-se um aumento semelhante da viabilidade celular ao longo do tempo, até atingirem níveis considerados não citotóxicos ao final de 24 horas. Estes resultados estão de acordo com os publicados por Marzenawyganowska-Swiatkowska *et al* em 2016, que para concentrações até 0,02% (200 mg/L) obteve comportamento semelhante em fibroblastos gengivais humanos⁶². Assim, não se rejeita a quinta hipótese nula, que indica: a citotoxicidade induzida pela CHX libertada após 24 horas de contacto não depende da concentração das soluções de imersão.

Estudos anteriores concluíram também que os materiais de rebasamento no seu estado original, após polimerização completa, não apresentam citotoxicidade para as células orais^{83,84}. Ayse Atay *et al* em 2012 concluíram especificamente que Ufi Gel® SC e Ufi Gel® hard C não induziram citotoxicidade, com uma percentagem média de viabilidade celular superior a 97,5% durante o período de estudo de 96 horas⁸³. Estes dados permitem assim concluir que a citotoxicidade observada na presente investigação pode ser atribuída apenas à ação da CHX veiculada pelos materiais.

Comparativamente com o método de incorporação de agentes antimicrobianos em materiais de rebasamento, extensamente explorado *in vitro*, o método de adsorção apresenta as seguintes vantagens: i) maior controlo sobre a quantidade de CHX libertada diariamente no local alvo, garantindo valores superiores ao MIC e, consequentemente, minimizando o risco de ocorrência de resistências; ii) ativação e inativação da veiculação consoante existe ou não infeção ativa, atendendo à capacidade de recarregamento diário da superfície da prótese; iii) veiculação de CHX durante o período de tempo terapêutico

necessário; e iv) substituição do material de rebasamento da base da prótese sempre que necessário, sem que o paciente fique privado da mesma.

Adicionalmente, a imersão diária da superfície rebasada da prótese na solução de CHX obriga a que o paciente realize o necessário e recomendado descanso dos tecidos de suporte inflamados, funcionando dessa forma também como coadjuvante na terapia.

A realização deste estudo sugere que o transporte de CHX por adsorção na superfície de materiais de rebasamento pode constituir uma estratégia terapêutica útil para combater a EP, contudo estudos adicionais devem ser realizados para validar esta abordagem. A capacidade de adsorção e de liberação da CHX à superfície dos materiais pode ser confirmada por outras técnicas, nomeadamente através da leitura em HPLC, i.e., cromatografia líquida de alta eficiência. Adicionalmente, para validar os resultados de manutenção da atividade antifúngica obtidos, podem ser realizados outros testes, como a incubação dos lixiviados com uma suspensão padronizada de leveduras, ou confirmar se o material de rebasamento, após imersão, possui a capacidade de impedir a formação de um biofilme na sua superfície.

Por outro lado, a comparação entre estudos sobre os efeitos da CHX em células orais é difícil de realizar devido às diferentes metodologias aplicadas por cada autor. Neste trabalho a citotoxicidade da CHX transportada pelos materiais foi avaliada com uma linha celular de fibroblastos L929. Os resultados obtidos poderiam ser complementados com a utilização de uma linha primária de fibroblastos gengivais humanos. Além disso, de forma a mimetizar a possível citotoxicidade desta opção de tratamento a nível clínico, poderia ser realizada uma exposição repetida dos fibroblastos à CHX.

Com base neste trabalho seria oportuno em investigações futuras i) confirmar se as cinéticas de liberação obtidas se verificam na presença de saliva e ii) avaliar a capacidade de veiculação pela superfície dos acrílicos utilizados na confecção de próteses.

5. Conclusão

De acordo com esta investigação é possível concluir que a superfície dos materiais de rebasamento de próteses dentárias tem a capacidade de adsorver CHX pelo método de imersão em solução e que a sua utilização como medida terapêutica nos casos de EP, para veicular o agente antimicrobiano e manter concentrações terapêuticas nas áreas afetadas, pode ser considerada uma terapia alternativa útil, viável e prática.

A CHX inicialmente adsorvida pela superfície dos materiais mantém a sua atividade antifúngica contra *C. albicans* ao ser libertada e a quantidade veiculada é diretamente dependente da concentração das soluções de imersão iniciais, características que se mantêm com o recarregamento dos materiais. O material Ufi Gel® hard C apresentou maior capacidade de veiculação da CHX do que o material Ufi Gel® SC.

A imersão dos provetes por 8 horas numa solução de 2,5% de CHX assegurou a melhor concentração de CHX capaz de impedir o desenvolvimento de um biofilme, sem induzir citotoxicidade.

Referências bibliográficas

1. Petersen PE. Global policy for improvement of oral health in the 21st century-implications to oral health research of World Health Assembly 2007, World Health Organization. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2009;37(1):1-8.
2. Saliba TA, Ortega MM, Goya KK, Moimaz SAS, Garbin CAS. Influence of oral health on the quality of life of institutionalized and noninstitutionalized elderly people. *Dent Res J (Isfahan)*. 2018;15(4):256-63.
3. Dyas R, Nathanael M, Indrasari M, Masulili C, Rahardjo TB, Agustin D, et al. Analysis of the effects of removable dentures on the psychological status, quality of life, and masticatory function of the elderly. *J Phys: Conf Ser*. 2017;884:1-7.
4. Côrte-Real IS, Figueiral MH, Reis Campos JC. As doenças orais no idoso – considerações gerais. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2011;52(3):175-80.
5. Bettencourt AF, Feliz M, Sousa C, Gonçalves L, Neves CB. An acrylic reline resin loaded with chlorhexidine: insights on drug release. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2016;57(3):125-31.
6. Gleiznys A, Zdanavičienė E, Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015;17(2):54-66.
7. Jones JA, Orner MB, Spiro A, 3rd, Kressin NR. Tooth loss and dentures: patients' perspectives. *Int Dent J*. 2003;53(5):327-34.
8. Myint Oo KZ, Fueki K, Yoshida-Kohno E, Hayashi Y, Inamochi Y, Wakabayashi N. Minimal clinically important differences of oral health-related quality of life after removable partial denture treatments. *J Dent*. 2019;92:1-28.
9. Sugio CYC, Gomes ACG, Maciel JG, Procópio ALF, Neppelenbroek KH. Considerações sobre os tipos de próteses parciais removíveis e seu impacto na qualidade de vida. *Rev Odontol Arac*. 2019;40(2):15-21.
10. The Glossary of Prosthodontic Terms: Ninth Edition. *J Prosthet Dent*. 2017;117(5):1-105.

11. Malakhov A, Wen J, Zhang BX, Wang H, Geng H, Chen XD, et al. Rechargeable anticandidal denture material with sustained release in saliva. *Oral Dis.* 2016;22(5):391-8.
12. Sun X, Cao Z, Yeh CK, Sun Y. Antifungal activity, biofilm-controlling effect, and biocompatibility of poly(N-vinyl-2-pyrrolidinone)-grafted denture materials. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;110:96-104.
13. Fonseca P, Areias C, Figueiral MH. Higiene de próteses removíveis. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2007;48(3):141-6.
14. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS One.* 2015;10(9):1-22.
15. Olms C, Yahiaoui-Doktor M, Remmerbach TW, Stingu CS. Bacterial colonization and tissue compatibility of denture base resins. *Dent J.* 2018;6(2):1-12.
16. Sharma S, Hegde V. Comparative evaluation of antifungal activity of melaleuca oil and fluconazole when incorporated in tissue conditioner: an in vitro study. *J Prosthodont.* 2014;23(5):367-73.
17. Costa J, Bettencourt A, Madeira A, Nepomuceno L, Portugal J, Neves CB. Surface properties after chemical aging of chlorhexidine delivery systems based on acrylic resin. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2019;60(4):155-62.
18. Goiato MC, dos Santos DM, Medeiros RAd, Paulini MB, Matheus HR. Técnicas de reembasamento para prótese total. *Rev Odontol Arac.* 2013:61-6.
19. Küçük C, Özkan YK. Clinical applications of soft lining materials. *Compl Dent Prosthodont.* 2018:223-40.
20. Kreve S, Dos Reis AC. Denture liners: a systematic review relative to adhesion and mechanical properties. *Sci World J.* 2019;2019:1-11.
21. Bertolini MM, Portela MB, Curvelo JA, Soares RM, Lourenço EJ, Telles DM. Resins-based denture soft lining materials modified by chlorhexidine salt incorporation: an in vitro

analysis of antifungal activity, drug release and hardness. *Dent Mater J*. 2014;30(8):793-8.

22. Michelon M, Campos K, Fernandes Q, Telles D, Vidigal G. Chlorhexidine incorporated into the prosthesis as a treatment strategy for denture stomatitis. *Rev Bras Odontol*. 2017;74(4):288-93.

23. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251-60.

24. Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(5):669-72.

25. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca P, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors—a large cohort. *J oral rehabil*. 2007;34(6):448-55.

26. Bueno MG, Sousa EJB, Hotta J, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Surface properties of temporary soft liners modified by minimum inhibitory concentrations of antifungals. *Braz Dent J*. 2017;28(2):158-64.

27. Susewind S, Lang R, Hahnel S. Biofilm formation and *Candida albicans* morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses*. 2015;58(12):719-27.

28. Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS. Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of *Candida albicans*. *Gerodontology*. 2010;27(4):292-6.

29. Simões RJ, Fonseca P, Figueiral MH. Infecções por *cândida* spp na cavidade oral. *Odontol Clín-Cient (Online)*. 2013;12(1):19-22.

30. Puryear J. Denture stomatitis – a clinical update. *Dent Update*. 2016;43(6):529-30, 33-5.

31. Barbeau J, Séguin 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):51-9.

32. Figueiral MH, Fonseca P, Lopes MM, Pinto E, Pereira-Leite T, Sampaio-Maia B. Effect of denture-related stomatitis fluconazole treatment on oral *Candida albicans* susceptibility profile and genotypic variability. *Open Dent J*. 2015;9:46-51.
33. Gad MM, Fouda SM. Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatitis treatment. *Dent Med Probl*. 2020;57(1):95-102.
34. Pontes MR, Capella DL, Bortoluzzi MC. Tratamento da estomatite protética e o impacto sobre a qualidade de vida, halitose, fluxo e ph salivar: estudo piloto. *Unoesc & Ciência-ACBS*. 2013;4(1):101-10.
35. Budtz-Jørgensen E, Bertram U. Denture stomatitis I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odont Scand*. 1970;28(1):71-92.
36. Newton A. Denture sore mouth. *Brit Dent J*. 1962;112:357-60.
37. Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran A, Barrow D, Barros S, et al. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow, and dry mouth. *J Prosthodont*. 2013;22(1):13-22.
38. Biernasiuk A, Szymańska J, Kustra A, Korona-Główniak I, Malm A. In vitro susceptibility of oral *Candida albicans* isolates to chlorhexidine. *Acta Pol Pharm - Drug Research*. 2018;75(3):795-802.
39. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol*. 2018;26(3):229-42.
40. Busscher H, Rinastiti M, Siswomihardjo W, Van der Mei H. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*. 2010;89(7):657-65.
41. Monteiro DR, Takamiya AS, Feresin LP, Gorup LF, de Camargo ER, Delbem AC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. *J Prosthodont Res*. 2015;59(1):42-8.
42. Satthanakul P, Taweechaisupapong S, Luengpailin S, Khunkitti W. The antifungal efficacy of essential oils in combination with chlorhexidine against *Candida* spp. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2019;41(1):144-50.

43. Izumida FE, Jorge JH, Ribeiro RC, Pavarina AC, Moffa EB, Giampaolo ET. Surface roughness and *Candida albicans* biofilm formation on a reline resin after long-term chemical disinfection and toothbrushing. *J Prosthet Dent*. 2014;112(6):1523-9.
44. Maluf CV, Janott-Sarlo CA, Bertolini MM, Menezes LR, Lourenço EJV, Telles DM. In vitro evaluation of physicochemical properties of soft lining resins after incorporation of chlorhexidine. *J Prosthet Dent*. 2020;124(5):1-7.
45. Neppelenbroek KH. Sustained drug-delivery system: a promising therapy for denture stomatitis? *J Appl Oral Sci*. 2016;24(5):420-2.
46. Bueno M, Urban V, Barbério G, Da Silva W, Porto V, Pinto L, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral dis*. 2015;21(1):57-65.
47. Ryalat S, Darwish R, Amin W. New form of administering chlorhexidine for treatment of denture-induced stomatitis. *Ther Clin Risk Manag*. 2011;7:219-25.
48. Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite JD, Rautemaa R. Fungicidal amounts of antifungals are released from impregnated denture lining material for up to 28 days. *J Dent*. 2012;40(6):506-12.
49. Rijo I, Pedro D, Costa J, Bettencourt A, Portugal J, Neves CB. Chlorhexidine loading of acrylic reline resins - microhardness and flexural strength after thermal aging. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2018;59(3):154-61.
50. Cao Z, Sun X, Yeh CK, Sun Y. Rechargeable infection-responsive antifungal denture materials. *J Dent Res*. 2010;89(12):1517-21.
51. Villar CC, Lin AL, Cao Z, Zhao XR, Wu LA, Chen S, et al. Anticandidal activity and biocompatibility of a rechargeable antifungal denture material. *Oral Dis*. 2013;19(3):287-95.
52. Amin WM, Al-Ali MH, Salim NA, Al-Tarawneh SK. A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis. *Eur J Dent*. 2009;3(4):257-66.

53. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013;24(2):89-102.
54. Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine--pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(7):1321-6.
55. Maluf CV, Peroni LV, Menezes LR, Coutinho W, Lourenço EJV, Telles DM. Evaluation of the physical and antifungal effects of chlorhexidine diacetate incorporated into polymethyl methacrylate. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:1-9.
56. Zanatta F, Rösing C. Chlorexidine: actions's mechanisms and recent evidences of it's efficacy over supragingival biofilm context. *Scientifica.* 2007;1(2):35-43.
57. Machado FC, Portela MB, Cunha AC, Souza IPRd, Soares RMdA, Castro GFBdA. Antifungal activity of chlorhexidine on *Candida* spp. biofilm. *Rev odontol UNESP.* 2013;39(5):271-5.
58. Tomás I, Cousido MC, García-Caballero L, Rubido S, Limeres J, Diz P. Substantivity of a single chlorhexidine mouthwash on salivary flora: influence of intrinsic and extrinsic factors. *J Dent.* 2010;38(7):541-6.
59. Reda B, Hollemeyer K, Trautmann S, Hannig M, Volmer DA. Determination of chlorhexidine retention in different oral sites using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Arch Oral Biol.* 2020;110:1-6.
60. Barros J, Grenho L, Fernandes MH, Manuel CM, Melo LF, Nunes OC, et al. Anti-sessile bacterial and cytocompatibility properties of CHX-loaded nanohydroxyapatite. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;130:305-14.
61. de Souza CA, Colombo AP, Souto RM, Silva-Boghossian CM, Granjeiro JM, Alves GG, et al. Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;87(2):310-8.
62. Wyganowska-Swiatkowska M, Kotwicka M, Urbaniak P, Nowak A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *Int J Mol Med.* 2016;37(6):1594-600.

63. Procópio ALF, da Silva RA, Maciel JG, Sugio CYC, Soares S, Urban VM, et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of denture base acrylic resin impregnated with cleaning agents after long-term immersion. *Toxicol In Vitro*. 2018;52:8-13.
64. Urban VM, Seó RS, Giannini M, Arrais CA. Superficial distribution and identification of antifungal/antimicrobial agents on a modified tissue conditioner by SEM-EDS microanalysis: a preliminary study. *J Prosthodont*. 2009;18(7):603-10.
65. Kozlovsky A, Artzi Z, Moses O, Kamin-Belsky N, Greenstein RB. Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces. *J Periodontol*. 2006;77(7):1194-200.
66. Lim BS, Cheng Y, Lee SP, Ahn SJ. Chlorhexidine release from orthodontic adhesives after topical chlorhexidine treatment. *Eur J Oral Sci*. 2013;121(3 Pt 1):211-7.
67. Akca AE, Akca G, Topçu FT, Macit E, Pıkdöken L, Özgen I. The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: an in vitro study. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1-8.
68. ISO. ISO 10993–5: 2009, Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. 2009.
69. Chen F, Wu T, Cheng X. Cytotoxic effects of denture adhesives on primary human oral keratinocytes, fibroblasts and permanent L929 cell lines. *Gerodontology*. 2014;31(1):4-10.
70. Kabawat M, de Souza RF, Badaró MM, de Koninck L, Barbeau J, Rompré P, et al. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont*. 2014;27(4):311-9.
71. Yurdukoru B, Terzioğlu H, Yilmaz T. Assessment of whole saliva flow rate in denture wearing patients. *J Oral Rehabil*. 2001;28(1):109-12.
72. Darvell BW, Clark RK. The physical mechanisms of complete denture retention. *Br Dent J*. 2000;189(5):248-52.
73. Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(6):340-6.

74. Cortizo MC, Oberti TG, Cortizo MS, Cortizo AM, Fernández Lorenzo de Mele MA. Chlorhexidine delivery system from titanium/polybenzyl acrylate coating: evaluation of cytotoxicity and early bacterial adhesion. *J Dent*. 2012;40(4):329-37.
75. Franco CF, Pataro AL, Souza LC, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. *Artif Organs*. 2003;27(5):486-91.
76. Li J, Barrow D, Howell H, Kalachandra S. In vitro drug release study of methacrylate polymer blend system: effect of polymer blend composition, drug loading and solubilizing surfactants on drug release. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(2):583-8.
77. Patel MP, Cruchley AT, Coleman DC, Swai H, Braden M, Williams DM. A polymeric system for the intra-oral delivery of an anti-fungal agent. *Biomaterials*. 2001;22(17):2319-24.
78. Tallury P, Airrabeelli R, Li J, Paquette D, Kalachandra S. Release of antimicrobial and antiviral drugs from methacrylate copolymer system: effect of copolymer molecular weight and drug loading on drug release. *Dent Mater J*. 2008;24(2):274-80.
79. Tallury P, Alimohammadi N, Kalachandra S. Poly(ethylene-co-vinyl acetate) copolymer matrix for delivery of chlorhexidine and acyclovir drugs for use in the oral environment: effect of drug combination, copolymer composition and coating on the drug release rate. *Dent Mater J*. 2007;23(4):404-9.
80. Marín Zuluaga DJ, Gómez Velandia OC, Rueda Clauijo DM. Denture-related stomatitis managed with tissue conditioner and hard autopolymerising reline material. *Gerodontology*. 2011;28(4):258-63.
81. Brożek R, Koczorowski R, Rogalewicz R, Voelkel A, Czarnecka B, Nicholson JW. Effect of denture cleansers on chemical and mechanical behavior of selected soft lining materials. *Dent Mater J*. 2011;27(3):281-90.
82. Coelho AS, Laranjo M, Gonçalves AC, Paula A, Paulo S, Abrantes AM, et al. Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. *Odontology*. 2020;108(2):260-70.
83. Atay A, Bozok Cetintas V, Cal E, Kosova B, Kesercioglu A, Guneri P. Cytotoxicity of hard and soft denture lining materials. *Dent Mater J*. 2012;31(6):1082-6.

84. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont*. 2004;17(3):340-4.

Anexos

Declaração de Autoria

Monografia de Investigação

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de investigação/Relatório de Estágio, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 21 de maio de 2021

O Estudante

(Estudante da FMDUP)

Parecer da Orientadora para entrega definitiva do trabalho apresentado

Informo que o trabalho de monografia desenvolvido pelo estudante João Pedro da Cunha Torres Vieira, com o título “Adsorção de clorexidina por materiais de rebasamento de prótese”, está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 21 de maio de 2021

A Orientadora

(Professora Auxiliar Convidada da FMDUP)

Parecer da Coorientadora para entrega definitiva do trabalho apresentado.

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pelo estudante João Pedro da Cunha Torres Vieira, com o título “Adsorção de clorexidina por materiais de rebasamento de prótese”, está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 21 de maio de 2021

A Coorientadora

(Professora Catedrática da FMDUP)