

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LETÍCIA MACHADO GONÇALVES

**AÇÃO DO ÁCIDO UNDECILÊNICO LIBERADO POR MATERIAL
REEMBASADOR SOBRE OS BIOFILMES DE *Candida albicans* OU
*Candida glabrata***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica
Odontológica, na Área de Prótese Dental.

Orientador: Prof. Dr. Wander José da Silva

Este exemplar corresponde à
versão final da Dissertação
defendida pela aluna e
orientada pelo Prof. Dr. Wander
José da Silva.

Assinatura do orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

G586a Gonçalves, Letícia Machado, 1987-
Ação do ácido undecilênico liberado por material reembasador
sobre os biofilmes de *Candida albicans* ou *Candida glabrata* /
Letícia Machado Gonçalves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Wander José da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Reembasadores de prótese dentária. 2. Antifúngicos. 3.
Fatores de virulência. I. Silva, Wander José da, 1948- II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia
de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effects of undecylenic acid released from denture liner on
Candida albicans or *Candida glabrata* biofilms

Palavras-chave em Inglês:

Denture liners
Antifungal agents
Virulence factors

Área de concentração: Prótese Dental

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Wander José da Silva [Orientador]

Fernanda Faot

Carlos Eduardo Vergani

Data da defesa: 18-05-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 18 de Maio de 2012, considerou a candidata LETÍCIA MACHADO GONÇALVES aprovada.

Handwritten signature of Wander José da Silva in blue ink.

Prof. Dr. WANDER JOSÉ DA SILVA

Handwritten signature of Fernanda Faot in blue ink.

Profa. Dra. FERNANDA FAOT

Handwritten signature of Carlos Eduardo Vergani in blue ink.

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO VERGANI

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pela presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e me confortar nas horas difíceis.

Aos meus queridos pais, **Alberto César e Rosário de Maria**, pelo amor incondicional. Vocês me propiciaram uma vida digna, onde eu pudesse crescer acreditando que tudo é possível desde que sejamos honestos, íntegros e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua; que sonhar e concretizar os sonhos só depende da nossa vontade. Obrigada por sempre apoiarem as minhas escolhas.

Ao meu irmão **Rafael**, pelo amor, amizade e compreensão. Além de um excelente irmão, é um homem de qualidades nobres. Obrigada pelo exemplo e por sempre me estimular a continuar nesta jornada.

Ao **Sabino**, pelo amor, dedicação e apoio incansáveis. Pela amizade incondicional, pela força, confiança e também pela paciência nos meus “maus” momentos. Você tem sido minha fortaleza. Graças a sua presença foi mais fácil transpor os dias de desânimo e cansaço. Amor é o sentimento mais simples e sincero que dedico a você.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Wander José da Silva**, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Agradeço pelo respeito, confiança, ensinamentos e, principalmente, pela amizade. Obrigada por ser um exemplo de motivação, pelas inúmeras oportunidades de crescimento profissional a mim concedida e pelas palavras certas e conselhos indispensáveis em cada momento desta jornada. Sinto-me extremamente honrada e orgulhosa por ser sua orientada.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, pelo acompanhamento, incentivo ao estudo e exemplo de pesquisadora. A senhora é um modelo de dedicação ao trabalho e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, e do Diretor Associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**.

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, a quem agradeço também por todos os ensinamentos e pelo exemplo a ser seguido.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Márcio de Moraes**.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP**, e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq**, pelas bolsas concedidas (Bolsa de Mestrado 2010/ 1270-4 e Auxílio à Pesquisa 472168/ 2010-0).

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury** e às **Profas. Dras. Cíntia Pereira Machado Tabchoury** e **Lívia Maria Andaló Tenuta** do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, por todo conhecimento compartilhado e pelo uso do Laboratório de Bioquímica Oral.

À **Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder** do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da Universidade Estadual de Campinas, por toda ajuda e suporte durante as análises cromatográficas realizadas neste estudo.

Ao **Dr. Adilson Sartoratto**, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da Universidade Estadual de Campinas, pela execução das técnicas de cromatografia gasosa desta pesquisa e por toda a disponibilidade a nós concedida.

Ao **Sinésio Boaventura Júnior**, químico do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos de procedimentos químicos essenciais para o desenvolvimento de parte desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Pedro Duarte de Novaes**, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, responsável pelo Laboratório de Microscopia Confocal a Laser, pelo uso desta instalação.

À **Thaís Gonçalves**, pelas nossas conversas e parcerias. Muito te agradeço pela amizade, ensinamentos e ajuda com as atividades de laboratório.

À **Juliana Botelho**, minha primeira e grande amiga de Piracicaba. Obrigada pela amizade, carinho e apoio constantes.

Aos amigos **Ataís Bacchi**, meu parceiro em atendimentos clínicos; **Flávia Viu**, primeira companheira das atividades de laboratório; e **Andréa Vasconcellos**, pela amizade, apoio e parceria nas atividades de pesquisa.

Aos colegas da Pós-Graduação **Alfonso Ayala, Ana Paula Martins, Andréa Vasconcellos, Antônio Pedro Ricomini, Arcelino Neto, Ataís Bacchi, Bruno Sotto-Maior, Camila Heitor, Camila Lima, Caroline Hanada Odo, Carolina Meloto, Germana Camargos, Giselle Rodrigues Ribeiro, Indira Cavalcanti, Izabella Patta, Larissa Vilanova, Livia Foster, Luana Aquino, Luzmila Rojas, Marcele Pimentel, Mariana Agostinho, Plínio Senna, Sabrina Rodrigues, Silvia Lucena, Sheila Porta, Thaís Gonçalves e William Custódio**, pela convivência sempre agradável. Muito obrigada a cada um de vocês.

Aos técnicos **Sra. Gislaine Piton** do Laboratório de Prótese Parcial Removível; **Sr. Waldomiro Vieira Filho** e **Sr. José Alfredo da Silva** do Laboratório de Bioquímica Oral. A todos, obrigada pelo suporte concedido durante a realização deste estudo.

Às **Sras. Érica Alessandra Pinho Sinhoreti e Raquel Q. Marcondes Cesar Sacchi**, secretárias da Coordenadoria Geral dos Programas de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba; à **Priscilla Zuzi Boldrin**, secretária o Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica e à **Eliete Aparecida Ferreira Marim** secretária do Departamento de Prótese e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela atenção e disponibilidade.

A todos que em algum momento estiveram ao meu lado nesta jornada, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os materiais reembasadores para próteses dentais removíveis, após a exposição à cavidade bucal, apresentam alterações estruturais que facilitam a colonização por espécies de *Candida*. Neste contexto, o ácido undecilênico (AUD) tem sido incorporado na formulação deste material na tentativa de reduzir o desenvolvimento de biofilmes fúngicos. No entanto, concentrações de AUD liberadas pelo material reembasador e os efeitos destas sobre o desenvolvimento dos biofilmes de *Candida* ainda não foram elucidados. Por isso, a proposta deste estudo foi investigar a cinética de liberação do AUD a partir do material reembasador e avaliar o efeito deste sobre o desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans* ou *C. glabrata*. Inicialmente, simulou-se *in vitro* a liberação do AUD na cavidade bucal através da imersão de corpos de prova de material reembasador (10 mm x 2 mm) em saliva artificial, sendo o produto da liberação quantificado através de cromatografia gasosa. Em seguida, a suscetibilidade de um isolado de referência e dois isolados clínicos de *C. albicans* (ATCC 90028, P01 e P34) e *C. glabrata* (ATCC 2001, P11 e P31) ao AUD foi investigada através da concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM) e tempo de morte celular (*time-kill*). Para avaliar o efeito do AUD sobre os biofilmes de *Candida*, películas de saliva foram formadas na superfície de corpos de prova de material reembasador contendo AUD (grupo experimental) ou não (controle) e, em seguida, biofilmes dos isolados citados foram formados sobre estas superfícies. Nos períodos de adesão, 24, 48 e 72 h de desenvolvimento dos biofilmes, foram realizadas análises de contagem celular através de diluição decimal seriada; de atividade metabólica através da redução mitocondrial do XTT; de estrutura dos biofilmes através da microscopia confocal a laser; e secreção enzimática de proteinases e fosfolipases através de métodos colorimétricos. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida de teste de Tukey com nível de significância de 5%. As concentrações de AUD liberadas pelo material reembasador estavam dentro dos intervalos de CIM e CFM encontrados para todos os isolados avaliados. Pelo teste de *time-kill* foi possível observar que na

CIM, o AUD teve ação fungistática por até 8 horas de exposição, para todos os isolados investigados. A presença de AUD não alterou a contagem celular, atividade metabólica, estrutura dos biofilmes e secreção enzimática nos estágios iniciais de colonização (adesão e 24 h) para ambas as espécies investigadas ($p > 0.05$). A exposição ao AUD resultou em menor contagem celular ($p < 0.05$) e atividade metabólica ($p = 0.001$) para os biofilmes maduros (48 e 72 h) de *C. albicans*, embora alterações estruturais e de secreção enzimática não foram identificadas ($p > 0.05$). Em contraste, biofilmes maduros de *C. glabrata* apresentaram maior quantidade de células ($p = 0.004$), atividade metabólica ($p < 0.001$) e secreção de proteinases no grupo experimental ($p < 0.001$). Considerando as limitações deste estudo, pôde-se concluir que a liberação de AUD pelo material reembasador não evitou a colonização de biofilmes de *Candida*.

Palavras-chave: Reembasadores de Prótese Dentária; Ácidos Undecilênicos; Biofilmes; *Candida albicans*; *Candida glabrata*.

ABSTRACT

After exposure to oral cavity, denture liners exhibit structural alterations which facilitate colonization by *Candida* species. In this context, undecylenic acid (UDA) has been incorporated into denture liner formulation in an attempt to reduce the development of fungal biofilms. However, released concentrations of UDA from denture liner and its effects on *Candida* biofilms have not yet been elucidated. Therefore, the purpose of this study was to investigate the UDA-released concentrations from denture liner and evaluate its effects on *C. albicans* or *C. glabrata* biofilms development. Initially, it was simulated, in vitro, the UDA-releasing at oral cavity by immersing specimens of denture liner (10 mm x 2 mm) in artificial saliva, and the released product was quantified by gas chromatography. Then, susceptibility tests of a reference strain and two clinical isolates of *C. albicans* (ATCC 90028, P01 and P34) and *C. glabrata* (ATCC 2001, P11 and P31) for UDA were performed by minimal inhibitory concentration (MIC), minimal fungicidal concentration (MFC) and time-kill assays. For evaluate the effects of UDA-released on *Candida* biofilms, specimens of denture liner containing UDA (experimental group) or not (control group) were saliva-coated and then, biofilms of mentioned strains were developed on such surfaces. At adhesion phase, 24, 48 and 72 h, developed biofilms had their cells counts analyzed by serial dilution; metabolic activity by XTT reduction assay; biofilm structure by confocal laser microscopy; and enzymatic activity of proteinases and phospholipases by colorimetric methods. Data were subjected by analysis of variance followed by Tukey test with a significance level of 5%. UDA-released concentrations from denture liner were within the ranges of MIC and MFC for all strains evaluated. Time-kill results demonstrated that UDA at MIC had a fungistatic behavior for at least 8 hours of exposition for all strains investigated. The presence of UDA did not alter the cell counting, metabolic activity, biofilm structure and enzymatic secretion in the early stages of colonization (adhesion and 24 h) for both species investigated ($p > 0.05$). At UDA exposure, mature biofilms (48 and 72 h) of *C. albicans* presented lower cell counts ($p < 0.05$) and metabolic activity ($p = 0.001$), although structural changes

and enzymatic secretion were not identified ($p > 0.05$). In contrast, *C. glabrata* mature biofilms showed higher cell counts ($p = 0.004$), metabolic status ($p < 0.001$) and also high secretion of proteinases in the experimental group ($p < 0.001$). Within the limitations of this study, it could be concluded that UDA-released from DL did not avoid *Candida* biofilms colonization.

Keywords: Denture Liners; Undecylenic Acids; Biofilms; *Candida albicans*; *Candida glabrata*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO: Effects of undecylenic acid released from denture liner on <i>Candida</i> biofilms	05
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24
ANEXOS	29

INTRODUÇÃO

Mesmo com o desenvolvimento na área da Odontologia e com os investimentos feitos para a melhoria na saúde bucal da população, ainda é grande o número de indivíduos desdentados parciais e/ou totais. Os dados preliminares do SB Brasil 2010 (Brasil, 2012) demonstram melhorias nos indicadores de saúde bucal da população brasileira, principalmente da população adulta, com redução na demanda por próteses dentais. Entretanto, o grande problema ainda se concentra na população idosa (65-74 anos), dos quais 23% ainda necessitam de próteses totais e 15% de próteses parciais. Dessa forma, ainda é notável a necessidade de reabilitação desta população com próteses dentais removíveis (Braden *et al.*, 1995; Brosky *et al.*, 2003).

Nestas reabilitações, as próteses dentais removíveis geralmente são confeccionadas com resina à base de poli(metilmetacrilato), por suas boas qualidades estéticas, biocompatibilidade e custo-benefício (Brosky *et al.*, 2003). No entanto, por ser um material rígido, em algumas situações clínicas, o atrito da base acrílica com a mucosa adjacente pode gerar desconforto e/ou lesões aos tecidos de suporte (Shim & Watts, 2000; Goiato *et al.*, 2007). Além disso, em função do processo de reabsorção do osso alveolar, seja esta fisiológica e/ou patológica, pode ocorrer à desadaptação da prótese dental aos tecidos bucais, o que também causar irritação da mucosa (Bulad *et al.*, 2004; Boscato *et al.*, 2009; Hahnel *et al.*, 2011).

Com a finalidade de reduzir tais situações, os materiais reembasadores resilientes são frequentemente utilizados. Os reembasadores resilientes formam um grupo de materiais elásticos que preenchem total ou parcialmente a base das próteses dentais, com a finalidade de melhorar a adaptação aos tecidos de suporte e, conseqüentemente, permitir distribuição uniforme das cargas mastigatórias (Nikawa *et al.*, 2003; Pavan *et al.*, 2010; Hahnel *et al.*, 2011). Entre os materiais reembasadores destacam-se os à base de resina acrílica (Goiato *et al.*, 2007). Este tipo de material apresenta polímeros em sua composição, como o poli(etilmetacrilato), associados a solventes ou plastificantes, o que permite sua

característica de resiliência (Villar *et al.*, 2003). Por esta característica, o uso dos reembasadores resiliente é indicado em situações clínicas cujo rebordo residual se encontra reabsorvido ou em lâmina de faca, casos de traumas mecânicos aos tecidos bucais provocados pelo uso de próteses dentais mal adaptadas, além de instalação de próteses imediatas convencionais ou sobre implantes (Bulad *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2008; Radnai *et al.*, 2010).

Apesar da boa tolerância biológica, os materiais reembasadores estão susceptíveis a alterações estruturais, os quais são inerentes às suas propriedades físicas (Nikawa *et al.*, 1995; Nikawa *et al.*, 2003; Pavan *et al.*, 2010). Após a exposição à cavidade bucal, os materiais reembasadores a base de resina acrílica podem sofrer absorção de água e/ou saliva, bem como a eliminação de plastificantes e outros componentes solúveis. Este processo de lixiviação resulta em endurecimento progressivo, distorção e alteração de rugosidade (Braden *et al.*, 1995). Além disso, o material reembasador também se torna suscetível ao envelhecimento. A manutenção deste na cavidade bucal por períodos que ultrapassem as recomendações dos fabricantes pode afetar sua rugosidade em decorrência da abrasão pelos tecidos de suporte e métodos de higienização, como escovação ou limpadores químicos (Goiato *et al.*, 2007).

Dessa forma, as alterações sofridas pelos materiais reembasadores torna-o um substrato de fácil colonização por microrganismos, tendo em vista que sua rugosidade de superfície dificulta a higienização e protege os microrganismos contra forças que tendem a deslocá-lo nas fases iniciais de colonização (Taylor *et al.*, 2008; Pereira-Cenci *et al.*, 2008a; Boscato *et al.*, 2009; Pavan *et al.*, 2010). Dentre estes microrganismos, autores evidenciam alta prevalência de espécies de *Candida* (Espinoza *et al.*, 2003; Dar-Odeh & Shehabi, 2003; Ramage *et al.*, 2004; Zaremba *et al.*, 2006; Figueiral *et al.*, 2007) que, em condições predisponentes como próteses dentais desadaptadas, higiene bucal deficiente, imunossupressão e/ou uso indiscriminado de antibióticos (Nucci & Marr, 2005), podem levar ao desenvolvimento de candidose associada ao uso de prótese dental (Dar-Odeh & Shehabi, 2003; Ramage *et al.*, 2004). Tal patologia caracteriza-se por um

processo inflamatório na mucosa bucal adjacente à prótese dental removível e acomete cerca de 45,3% destes usuários (Figueiral *et al.*, 2007).

Na candidose associada ao uso de prótese dental, a *C. albicans* atua como principal agente etiológico e o mais virulento, o que está diretamente relacionado a sua capacidade de aderência a substratos bióticos e abióticos (Kumamoto & Vinces, 2005; Zaremba *et al.*, 2006). O dimorfismo celular sofrido por esta espécie, no qual ocorre a conversão de células germinativas (leveduras) para a forma de crescimento filamentosas (hifas), é o fator responsável por esta eficiência (Ramage *et al.*, 2004; Kumamoto & Vinces, 2005). Além disso, a secreção de enzimas hidrolíticas pelas células promove irritação da mucosa bucal, desencadeando o processo inflamatório característico da patologia (Ghannoum, 2000; Lyon & Resende, 2006). No entanto, apesar da *C. albicans* ser considerada o patógeno mais importante, outras espécies de *Candida* também são comumente isoladas da superfície das próteses e da mucosa bucal, em especial a *C. glabrata* (Luo & Samaranayake, 2002; Zaremba *et al.*, 2006; Zomorodian *et al.*, 2011). Esta espécie tem sido estudada em função de sua alta patogenicidade, apesar de não formar hifas verdadeiras, e por apresentar resistência natural a antifúngicos (Luo & Samaranayake, 2002; Zaremba *et al.*, 2006; Thein *et al.*, 2007).

Durante a dinâmica de colonização e formação do biofilme na superfície do material reembasador, a aderência de *Candida* ao substrato é considerada como etapa inicial. Em seguida, inicia-se o processo de colonização propriamente dito com discreta formação de colônias que, após atingirem certo grau de organização, secretam uma matriz de polissacarídeos extracelulares conferindo sustentação e proteção ao biofilme que está em desenvolvimento (Chandra *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2010). Dessa forma, na tentativa de interferir nesta dinâmica e reduzir a colonização por *Candida*, o ácido undecilênico (AUD), em função de suas propriedades antifúngicas, tem sido incorporado pelo fabricante na formulação de um material reembasador resiliente à base de resina acrílica.

Sabe-se que o mecanismo de ação do AUD sobre células planctônicas de *C. albicans* está relacionado à capacidade da droga de inibir enzimas relacionadas

à síntese de ácidos graxos. Os ácidos graxos são molécula importantes na regulação do pH intracelular, e a inibição de sua síntese pode impedir a alcalinização do citoplasma (Stewart *et al.*, 1988). Sabendo que a alcalinização citoplasmática é necessária durante o processo de dimorfismo sofrido por esta espécie, o AUD atua inibindo a conversão de leveduras em hifas (McLain *et al.*, 2000). No entanto, cabe ressaltar que apesar da ação antifúngica do AUD ser reconhecida, o comportamento da *Candida* em estado planctônico difere de quando está organizada em biofilmes, realidade presente na superfície das próteses dentais, e esta diferença diz respeito principalmente à capacidade de resistir a antifúngicos (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2004; Watamoto *et al.*, 2009). Em acréscimo, apesar de o AUD ser sugerido como o composto responsável pela redução na contagem de células viáveis de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos neste tipo de material (Pereira-Cenci *et al.*, 2008b), as concentrações de AUD liberadas pelo reembasador e os efeitos destas sobre o desenvolvimento dos biofilmes de *Candida* ainda não foram avaliados.

Considerando a liberação do AUD pelo material reembasador no meio bucal, poderia-se pressupor concentrações abaixo da inibitória mínima. O crescimento de biofilmes de *Candida* nestas condições poderia estimular a secreção de enzimas hidrolíticas e, conseqüentemente, aumentar a patogenicidade destes (Copping *et al.*, 2005). Adicionalmente, levando em conta o mecanismo de ação do AUD sobre as células planctônicas de *C. albicans* (McLain *et al.*, 2000), durante o desenvolvimento dos biofilmes de *Candida*, este antifúngico poderia inibir seu dimorfismo, alterando a conformação estrutural e, conseqüentemente, a contagem celular e atividade metabólica. Frente ao exposto, a proposta deste estudo foi investigar a cinética de liberação do AUD pelo material reembasador e avaliar o efeito deste composto sobre o desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans* ou *C. glabrata*.

CAPÍTULO¹

Effects of undecylenic acid released from denture liner on *Candida* biofilms

Letícia Machado Gonçalves, D.D.S.^a; Altair Antoninha Del Bel Cury, D.D.S., M.Sc., Ph.D.^a; Adilson Sartoratto, D.D.S., M.Sc., Ph.D.^b; Vera Lúcia Garcia Rehder, D.D.S., M.Sc., Ph.D.^b; Wander José da Silva, D.D.S., M.Sc., Ph.D.^{a,*}

a. Department of Prosthodontics and Periodontology

Piracicaba Dental School, State University of Campinas

Avenida Limeira, 901. Zip code: 13414-903. Piracicaba, Sao Paulo, Brazil

b. Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture

State University of Campinas

Rua Alexandre Cazelatto, 999. Zip code: 13081-970. Paulinia, Sao Paulo, Brazil

**Corresponding author*

Department of Prosthodontics and Periodontology; Piracicaba Dental School, State University of Campinas. Avenida Limeira, 901. Zip Code: 13414-903. Piracicaba, São Paulo, Brazil. Phone: +55 19 21065294; fax +55 19 2106-5211; e-mail: wanderjose@fop.unicamp.br

¹ Este trabalho foi realizado no formato alternativo conforme Deliberação CCPG/002/06 da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas, sendo submetido ao periódico *Journal of Dental Research* (Anexo 3).

Abstract

Denture liners (DL) are easily colonized by *Candida* species. In an attempt to prevent biofilm colonization, undecylenic acid (UDA) has been incorporated in DL. In this *in vitro* study, the effects of UDA released from DL on *Candida* biofilms were investigated. The concentrations of UDA from commercial DL were determined by gas chromatography. Minimum inhibitory and fungistatic concentrations (MIC and MFC, respectively) tests were performed for *C. albicans* or *C. glabrata* using UDA in order to compare the concentrations released from DL. Specimens of DL with UDA (experimental group) and without UDA (control group) were fabricated and *Candida* biofilms were developed on DL surfaces. Biofilms were evaluated by cell counts, metabolic activity, structure and secretion of proteinase or phospholipase. UDA released were within the MIC and MFC ranges. In the presence of UDA, *C. albicans* biofilms were thinner with lower numbers of viable and active cells, although no significant enzymatic changes were observed relative to the control group ($p > 0.05$). In contrast, *C. glabrata* biofilms exhibited higher cell counts, greater metabolic activity and also increased proteinase activity in the presence of UDA relative to the control group ($p < 0.05$). Overall, UDA did not prevent *Candida* biofilm formation.

Keywords: Denture Liners; Undecylenic Acids; Biofilms; *Candida albicans*; *Candida glabrata*.

Introduction

Denture liners (DL) provide a uniform distribution of stress at the mucosa/lining interface, thereby reducing the traumatic effects that dentures may cause for patients with thin or resorbed alveolar ridges, and are also used for provisional dentures after teeth extraction or implant surgeries (Taylor *et al.*, 2008). In spite of their beneficial aspects, DL are known to be porous that are difficult to keep clean and may act as reservoirs for *Candida* species (Pereira-Cenci *et al.*,

2008a). When associated with biological factors, such as cellular immunity, salivary flow and dietary or local factors, including denture cleanliness or trauma (Coco et al., 2008), the presence of *C. albicans* or other non-*albicans* species, particularly *C. glabrata* (Li et al., 2007), on DL surfaces, can predispose patients to the onset of *Candida*-associated denture stomatitis (CADS) (Boscato et al., 2009).

CADS affect approximately 45.3% of denture wearers (Figueiral et al., 2007) and is clinically relevant for patients exposed to unexpected infections, particularly immunocompromised patients or the medicated elderly (Ramage et al., 2005). For this reason, denture materials containing or releasing antifungal agents have been proposed as a strategy for preventing *Candida* colonization (Cao et al., 2010; Radnai et al., 2010). In this context, manufacturers have been incorporating the antifungal agent undecylenic acid (UDA) in DL. Even though it is known that UDA inhibits the dimorphism of *C. albicans* planktonic cells (McLain et al., 2000) and has been implicated in the reduction of *Candida* cells on DL surfaces (Pereira-Cenci et al., 2008b), there have been no studies measuring the concentration of UDA released from DL or the effect of released UDA on *Candida* colonization. Therefore, the aim of our study was to measure the concentrations of UDA released from DL and determine the effects of UDA-containing DL on *C. albicans* or *C. glabrata* biofilm development and enzymatic activity *in vitro*.

Materials and methods

Experimental design

The *in vitro* study had a randomized and blinded design. Briefly, disc specimens were fabricated using DL with UDA (experimental group) or without UDA (control group). The surface roughness (SR) and surface free energy (SFE) of all specimens were measured. The concentrations of UDA released from the DL specimens were determined by gas chromatography. Susceptibility tests were performed for UDA against *C. albicans* or *C. glabrata*. Biofilms of both species were allowed to develop on discs surface for up to 72 h. Biofilm cell counts,

metabolic activity, structure, proteinase and phospholipase activity were measured at adhesion and after 24, 48 and 72 h.

Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). *Candida* reference strains (*C. albicans* ATCC 90028 and *C. glabrata* ATCC 2001) and two clinical isolates of each species were used.

Discs fabrication

Disc specimens (10 x 2 mm) were fabricated according to the manufacturers' directions using two commercial DL with similar chemical composition, one with UDA (experimental group) and one without UDA (control group). SR was standardized using a profilometer (Surfcoder SE 1700; Kosaka Laboratory Ltd., Kosaka, Japan). Three readings were made for both discs sides, until a mean value of $3.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ was obtained. SFE was measured on saliva-coated specimens using a goniometer (Ramé-Hart Instrument Co., NJ, USA) with an acid-base technique (Combe *et al.*, 2004). The total SFE was $50.8 \pm 0.67 \text{ mJ/m}^2$. After SR and SFE measurements, discs were ultrasonically cleansed in sterile water and used immediately.

Concentration of UDA from DL

All specimen discs were immersed in artificial saliva (1:10 w/v) with agitation for up to 168 h at 35°C. In order to determine the concentration of UDA present in the artificial saliva, each immersion solution was extracted twice with ethyl acetate (EtOAc) and concentrated in a rotary evaporator (35°C bath). Samples were analyzed using an HP 6890 gas chromatograph equipped with a HP 5975 mass-selective detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Initially, the amount of UDA in DL powder was determined (approximately 0.25%) and the concentrations released were calculated using standard curves generated from

dibutylphthalate and UDA standards. All tests were performed on five replicate samples.

***Candida* growth conditions**

Candida strains were aerobically cultured under agitation for 18-20 h at 35°C in yeast nitrogen base (YNB) supplemented with 50 mM glucose. Cells were harvested, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Inoculums were standardized optically to contain 10^7 cells/mL.

Susceptibility tests

Susceptibility tests were determined using M27-A3 standards (CLSI Document M27-A3, 2008) and time-kill curves were defined as described previously (Canton *et al.*, 2009). Negative controls were also conducted. All tests were performed in triplicate, on three different occasions.

Biofilm formation

Stimulated human saliva was collected, centrifuged (5 min, 10000 g, 4°C) and the supernatant was filter-sterilized and immediately used. The discs were placed vertically into a wells on a plate containing saliva and incubated under agitation for 1 h at 35°C to form a pellicle. Saliva-coated discs were then transferred to plates containing *Candida* inoculum prepared in YNB supplemented with 100 mM glucose, and incubated under agitation for 1.5 h (adhesion phase) at 35°C. The samples were washed twice with PBS, transferred to plates containing fresh YNB medium and incubated under agitation for up to 72 h at 35°C. At the end of each 24 h period, the samples were washed and fresh medium was added. After adhesion periods of 24, 48 and 72 h, biofilms were analyzed by conducting cell counts, metabolic activity, structure, proteinase and phospholipase activity measurements. All experiments were performed in triplicate, on three different occasions.

Biofilm analyses

For cell counts, the samples were immersed in PBS and sonicated at 7 W for 30s to disrupt the biofilm structure. The suspensions were serially diluted in PBS and samples were plated onto agar Sabouraud dextrose. Plates were incubated for 24 h at 35°C. Yeast cells were counted and data were expressed in cells/mL. Metabolic activity was analyzed using the XTT assay (da Silva *et al.*, 2008).

Biofilm structure was evaluated using confocal microscopy (Leica Microsystems CMS, Mannheim, Germany). The samples were stained using SYTO-9 and propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and incubated with protection from light for 20 min at 35°C. Images were captured at 1- μm intervals along the z-axis. COMSTAT software (Heydorn *et al.*, 2000) was used to determine the bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), average thickness (μm) and roughness coefficient (μm) of the biofilms.

For enzymatic activity measurements, the samples were sonicated and the suspensions were centrifuged (5 min, 10000 g). Measurements were then performed on the biofilm supernatant. Proteinase activity was determined as described previously (Pande *et al.*, 2006). Briefly, the supernatant was mixed with 1% azocasein at 1:9 (v/v) for 1 h, at which time the reaction was stopped with 10% trichloroacetic acid. Samples were then centrifuged and the absorbance of the supernatant was measured at 440 nm. Phospholipase activity was determined as previously described (Taniguchi *et al.*, 2009). Briefly, supernatants were mixed with an equal volume of phosphatidilcoline substrate, incubated for 1 h at 35°C, after which time the absorbance was measured at 630 nm. Specific proteinase and phospholipase activity was established as a function of biofilm dry weight.

All data were analyzed using two-way ANOVA tests followed by Tukey's HSD test, using SAS software (SAS Institute, version 9.0, Cary, NC, USA). A significance level of 5% was used for all comparisons.

Results

The mean concentration of UDA released from DL from the experimental group after 48 h of immersion was 344.97 ± 8.27 $\mu\text{g/mL}$. UDA release continued for up to seven days (Fig. 1A). Susceptibility tests were carried out and the minimal concentration required to inhibit *C. albicans* or *C. glabrata* growth was 256 $\mu\text{g/mL}$. The MFC values observed for both *Candida* species were 512 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 1A). In addition, time-kill measurements demonstrated that at the MIC concentration, UDA showed fungistatic behavior on *Candida* growth until 8 h (data not shown).

It was observed that the early stages of biofilm colonization (adhesion phase and 24 h after inoculation) were not influenced by the presence of UDA for all parameters investigated ($p > 0.05$) compared to the control group (data not shown). However, for mature *C. albicans* biofilms (48 and 72 h), UDA released from the DL had a significant effect, resulting in lower cell counts ($p < 0.05$) (Fig. 1B) and also lower metabolic activity ($p = 0.001$) (Fig. 1C) compared to the control group. In contrast, the cell count and metabolic activity of mature *C. glabrata* biofilms were significantly greater in the presence of UDA ($p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively) (Fig. 1B and 1C).

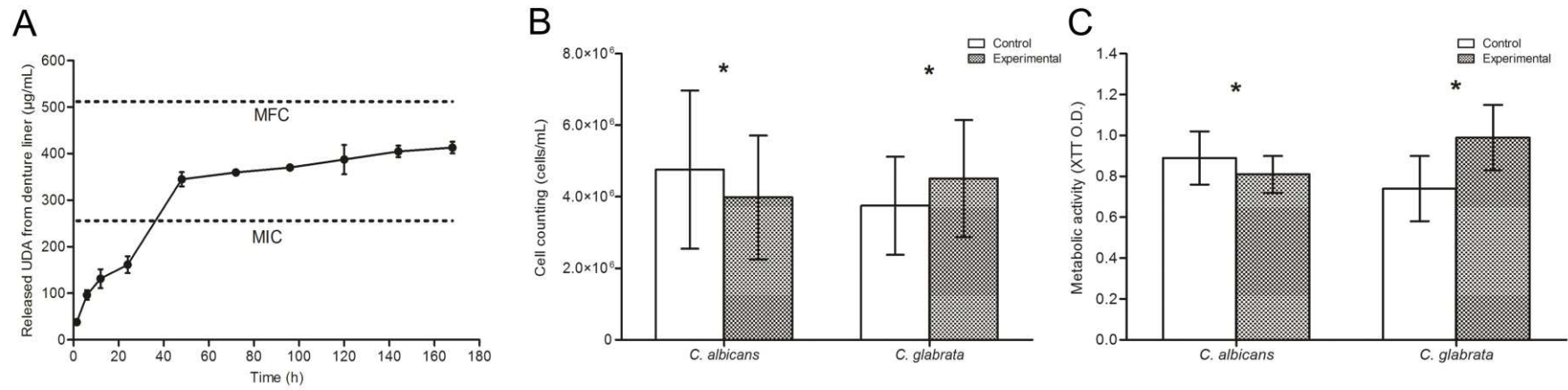


Figure 1. Concentration of UDA released from DL and its effects on *C. albicans* or *C. glabrata* mature biofilms. (A) Concentrations of UDA released and the effects of released UDA on (B) cell counts and (C) metabolic activity of *C. albicans* or *C. glabrata*. Symbol (*) represents statistically significant differences between the control and experimental groups within each *Candida* strain ($p < 0.05$).

Exposure to UDA released from DL resulted in thinner biofilms for *C. albicans* ($p < 0.05$) (Figs. 2B, 3A and 3B). For *C. glabrata* biofilms, the bio-volume increased ($p < 0.001$) (Fig. 2A) and the biofilm surface was regular with a lower roughness ($p < 0.001$) (Figs. 2C, 3C and 3D) in the experimental group as compared to control group. In terms of enzymatic activity, high proteinase secretion was observed for *C. glabrata* biofilms in the experimental group ($p < 0.001$) (Fig. 2D), while there was no statistically significant difference in phospholipase activity for the two *Candida* species ($p > 0.05$).

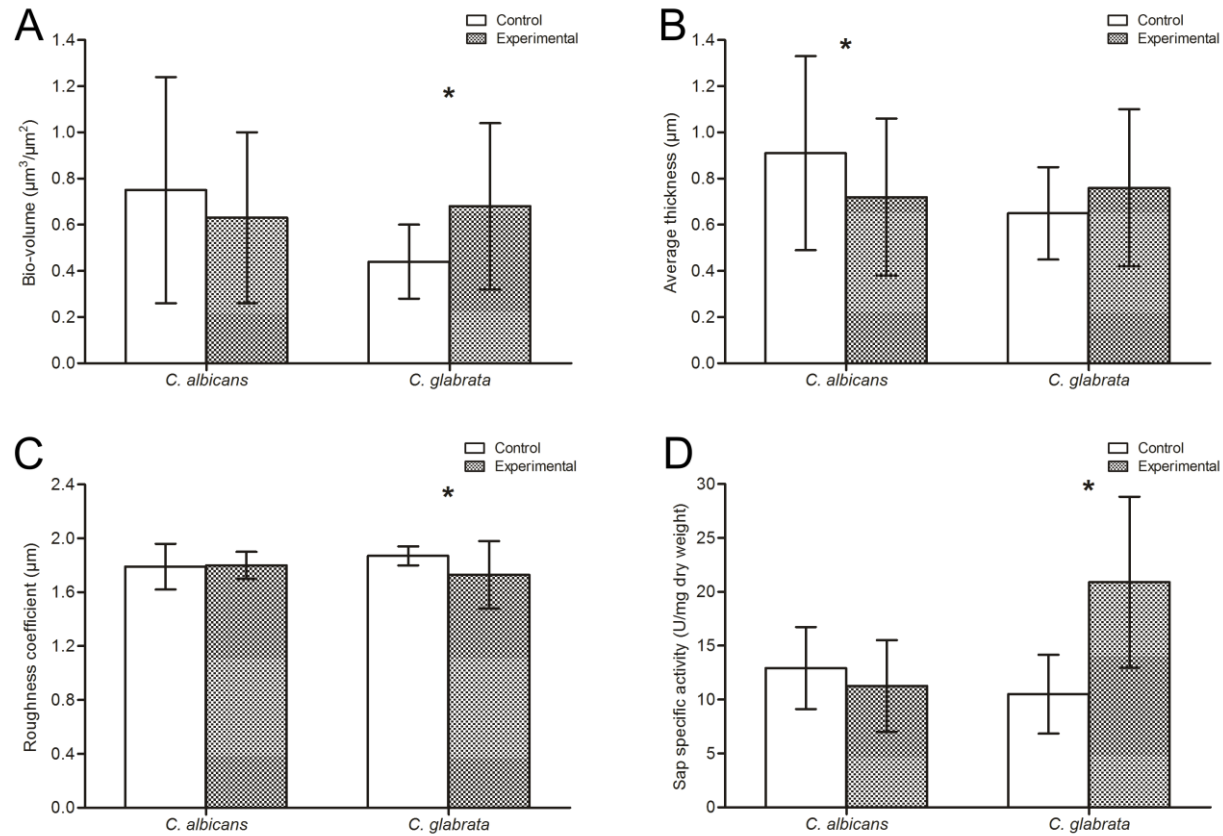


Figure 2. Structural parameters and proteinase secretion of mature *Candida* biofilms (A) Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), (B) average thickness (μm), (C) roughness coefficient (μm), and (D) specific proteinase activity (U/mg dry weight). Symbol (*) represents statistically significant differences between the control and experimental groups within each *Candida* strain ($p < 0.05$).

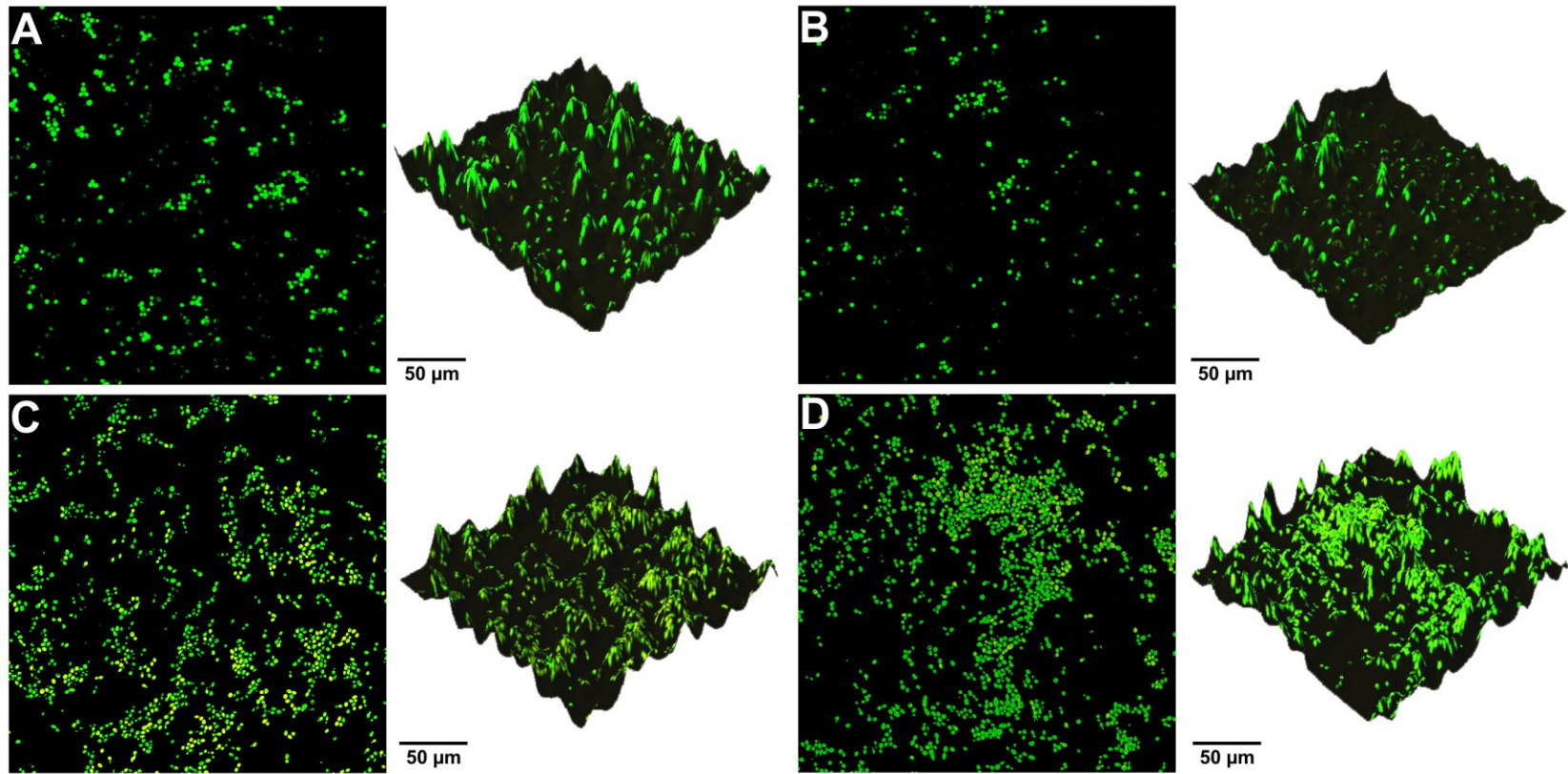


Figure 3. Confocal z-slices images and 3D reconstruction of mature *Candida* biofilms. (A) *C. albicans* biofilms for control and (B) experimental groups; (C) *C. glabrata* biofilms for control and (D) experimental groups.

Discussion

The incorporation of antifungal compounds in denture materials has been proposed as way to reduce *Candida* biofilm formation. However, it is unclear whether the concentration of antifungals released from denture materials are sufficient to inhibit *Candida* biofilm growth (Cao *et al.*, 2010). Therefore, this *in vitro* study was performed in order to investigate if the concentration of UDA released from DL is likely to be clinically effective. Releasing sub-inhibitory concentrations could actually stimulate the secretion of enzymes, thereby increasing the pathogenicity of biofilms (Wu *et al.*, 2000; Copping *et al.*, 2005). Furthermore, UDA can inhibit the conversion of blastopores to hyphae and/or pseudo-hyphae for *C. albicans* cells (McLain *et al.*, 2000), resulting in interference with biofilm structure, consequently affecting cellular viability and metabolic status. This study is the first to measure the concentration of UDA released from DL and to determine the effects of released UDA on *Candida* biofilms development and enzymatic activity.

In the present study, the results of the susceptibility tests suggest that UDA showed fungicidal activity against planktonic cells of the *Candida* species. Additionally, the concentrations of UDA released from DL were within the MIC and MFC ranges for up to a week. However, susceptibility tests were performed in planktonic cells while most *Candida* cells in the oral cavity are associated with biofilms. It is known that biofilms differ substantially from planktonic cells, particularly in terms of their higher antifungal resistance (Chandra *et al.*, 2001; Watamoto *et al.*, 2009).

In order to more effectively to mimic the oral cavity, the biofilm growth model used in this study was designed to simulate the relined surface of a complete upper denture, which is exposed to lower saliva flushing which can facilitate the establishment of *Candida* in a protected environment (Zomorodian *et al.*, 2011). Additionally, the effects of the concentration of released UDA on *Candida* biofilms were considered, thereby disregarding the possible diluting effect of saliva *in vivo*.

An important finding of our study was that UDA was not effective against the early stages of biofilm development for both species. This result could be explained

by the lower concentrations of UDA released at adhesion and after 24 h, indicating that this approach for administering UDA fails to prevent the first steps of a successful colonization. Time-kill results also demonstrated that at least 8 h are necessary to establish a fungistatic activity. In contrast, for mature biofilms, both *Candida* species were affected by concentrations of UDA released from DL. *C. albicans* exhibited lower numbers of viable and active cells in the experimental group, while the opposite was observed for the *C. glabrata* experimental group.

The decrease in cell counts and metabolic activity of *C. albicans* biofilms can be explained by the molecular mechanism of UDA which inhibits enzymes related to lipid metabolism. Inhibition of lipid metabolism disrupts regulation of the cytoplasmic pH by allowing protons to cross the plasma membrane, thereby interfering with alkalization of the cytoplasm (Stewart *et al.*, 1988). It has been shown that this process prevents the conversion of yeast to hyphae (McLain *et al.*, 2000) and that inhibition of such dimorphism is important, as there are correlations between the presence of hyphae cells and the formation of biofilms (Copping *et al.*, 2005).

In contrast, the cell count and metabolic activities of mature biofilms of *C. glabrata* increased with exposure to UDA. This result is important, as it has been suggested that the colonization and growth of *Candida* species on biological surfaces could indicate their pathogenic potential (Luo & Samaranayake, 2002). Even though the MIC values were the same for *C. albicans* and *C. glabrata*, our study found no activity for UDA against *C. glabrata* biofilms. This could be due to their known capacity for acquiring antifungal resistance and the fact that they do not form true hyphae (Li *et al.*, 2007).

Secretion of enzymes, particularly proteinase and phospholipase, is considered the main virulence factor of *Candida* as these enzymes increase the ability of the fungi to colonize and penetrate tissues (Ghannoum, 2000). Phospholipase secretion can be modulated by environmental conditions, such as medium pH (Ghannoum, 2000) rather than the number of cells present. We demonstrated that phospholipase activity was not altered by the presence of UDA

for both species, which could be explained by the similar medium pH conditions found in our study (3.6, data not shown). The increase in proteinase activity observed for *C. glabrata* could be related to the constant exposure of the biofilm to UDA during biofilm development. As UDA was not effective against *C. glabrata* biofilms, its presence could function instead as a stress factor, stimulating enzymatic secretion (Wu *et al.*, 2000; Copping *et al.*, 2005).

Regarding the observed biofilm structures, the presence of thinner *C. albicans* biofilms in the presence of UDA could be related to the lower cell counts observed and also a possible reduction in the number of hyphae. Furthermore, the reduction in growth, metabolism and virulence may also stimulate cell communication via several secreted molecules (Weber *et al.*, 2010). Therefore, these molecules could have contributed to the expression of a number of morphology-specific genes necessary for robust biofilm development (Han *et al.*, 2011). For *C. glabrata* biofilms, the higher bio-volume and lower roughness found in the experimental group, when taken together, indicates a more aggregated spatial conformation of the cells. In addition, such biofilm conformations and related matrices could act as a barrier to the diffusion of UDA, thereby limiting its access to cells located at basal layers.

Based on the results of this study, it is possible to conclude that UDA released from DL did not prevent *Candida* biofilm colonization. Further *in vivo* studies are necessary in order to determine whether the nutrient-rich environment of the oral cavity and the presence of saliva may affect the actions of UDA released from DL.

Acknowledgements

The authors would like to thank FAPESP (2010/1270-4) and to CNPq for the financial support (472168/2010-0).

References

Boscato N, Radavelli A, Faccio D, Loguercio AD (2009). Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of a soft denture-lining material. *Gerodontology* 26(3):210-213.

Canton E, Peman J, Valentin A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M (2009). *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 53(7):3108-3111.

Cao Z, Sun X, Yeh CK, Sun Y (2010). Rechargeable infection-responsive antifungal denture materials. *J Dent Res* 89(12):1517-1521.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ *et al* (2001). Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent Res* 80(3):903-908.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI Document M27-A3. CLSI, Pennsylvania, USA, 2008.

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G (2008). Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 23(5):377-383.

Combe EC, Owen BA, Hodges JS (2004). A protocol for determining the surface free energy of dental materials. *Dent Mater* 20(3):262-268.

Copping VM, Barelle CJ, Hube B, Gow NA, Brown AJ, Odds FC (2005). Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. *J Antimicrob Chemother* 55(5):645-654.

da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA (2008). Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J* 19(4):364-369.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C (2007). Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil* 34(6):448-455.

Ghannoum MA (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13(1):122-143.

Han TL, Cannon RD, Villas-Boas SG (2011). The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol* 48(8):747-763.

Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK et al (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146(10):2395-2407.

Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A (2007). *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res* 86(3):204-215.

Luo G, Samaranayake LP (2002). *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS* 110(9):601-610.

McLain N, Ascanio R, Baker C, Strohaber RA, Dolan JW (2000). Undecylenic acid inhibits morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44(10):2873-2875.

Pande M, Dubey VK, Yadav SC, Jagannadham MV (2006). A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchmanii*: purification and biochemical characterization. *J Agric Food Chem* 54(26):10141-10150.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM (2008a). Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci* 16(2):86-94.

Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM *et al* (2008b). The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol* 53(8):755-764.

Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS (2010). Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of *Candida albicans*. *Gerodontology* 27(4):292-296.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL (2005). *Candida biofilms*: an update. *Eukaryot Cell* 4(4):633-638.

Stewart E, Gow NA, Bowen DV (1988). Cytoplasmic alkalinization during germ tube formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 134(5):1079-1087.

Taniguchi L, de Fatima Faria B, Rosa RT, de Paula ECA, Gursky LC, Elifio-Esposito SL *et al* (2009). Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-

quantification of secretory phospholipase by *Candida albicans* grown in planktonic and biofilm phases. *J Microbiol Methods* 78(2):171-174.

Taylor RL, Bulad K, Verran J, McCord JF (2008). Colonization and deterioration of soft denture lining materials *in vivo*. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 16(2):50-55.

Watamoto T, Samaranayake LP, Jayatilake JA, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ (2009). Effect of filamentation and mode of growth on antifungal susceptibility of *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents* 34(4):333-339.

Weber K, Schulz B, Ruhnke M (2010). The quorum-sensing molecule E,E-farnesol- its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. *Yeast* 27(9):727-739.

Wu T, Wright K, Hurst SF, Morrison CJ (2000). Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 44(5): 1200–1208.

Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M *et al* (2011). Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol* 49(2):208-211.

CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, os resultados apontam que a liberação de AUD pelo material reembasador não evitou a colonização por biofilmes de *Candida* e, adicionalmente, estimulou os biofilmes de *C. glabrata*, reconhecida espécie patogênica.

REFERÊNCIAS*

1. Boscato N, Radavelli A, Faccio D, Loguercio AD. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of a soft denture-lining material. *Gerodontology*. 2009; 26(3):210-3.
2. Braden M, Wright PS, Parker S. Soft lining materials-a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1995; 3(4):163-74.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010. Nota para a Imprensa de 28/12/2010. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
4. Brosky ME, Pesun IJ, Morrison B, Hodges JS, Lai JH, Liljemark W. Clinical evaluation of resilient denture liners. Part 2: *Candida* count and speciation. *J Prosthodont*. 2003; 12(3):162-7.
5. Bulad K, Taylor RL, Verran J, McCord JF. Colonization and penetration of denture soft lining materials by *Candida albicans*. *Dent Mater*. 2004; 20(2):167-75.
6. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ *et al*. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80(3):903-8.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

7. Copping VM, Barelle CJ, Hube B, Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55(5):645-54.
8. da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 94(1):149-56.
9. Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses.* 2003; 46(5-6):187-91.
10. Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(10):571-5.
11. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(6):448-55.
12. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(1):122-43.
13. Goiato MC, Ribeiro PP, Santos DM, Antenucci RMF. Influencia del tiempo de almacenamiento sobre la dureza y rugosidad de materiales para rebasados resilentes. *RCOE.* 2007; 12:67-72.
14. Hahnel S, Rosentritt M, Burgers R, Handel G, Lang R. *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology.* 2011. [Epub ahead of print].

15. Kumamoto CA, Vines MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 2005; 59:113-33.
16. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS.* 2002; 110(9):601-10.
17. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(5):632-8.
18. McLain N, Ascanio R, Baker C, Strohaber RA, Dolan JW. Undecylenic acid inhibits morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10):2873-5.
19. Nikawa H, Jin C, Makihiro S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(3):243-50.
20. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T. Effect of components of resilient denture-lining materials on the growth, acid production and colonization of *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 1995; 22(11):817-24.
21. Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(4):521-6.
22. Pavan S, dos Santos PH, Filho JN, Spolidorio DM. Colonisation of soft lining materials by micro-organisms. *Gerodontology.* 2010; 27(3):211-6.

23. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008a; 16(2):86-94.
24. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM *et al.* The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008b; 53(8):755-64.
25. 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.
26. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98(1):53-9.
27. Shim JS, Watts DC. An examination of the stress distribution in a soft-lined acrylic resin mandibular complete denture by finite element analysis. *Int J Prosthodont.* 2000; 13(1):19-24.
28. Stewart E, Gow NA, Bowen DV. Cytoplasmic alkalization during germ tube formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 1988; 134(5):1079-87.
29. Taylor RL, Bulad K, Verran J, McCord JF. Colonization and deterioration of soft denture lining materials *in vivo*. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2008; 16(2):50-5.
30. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(12):1200-8.

31. Villar A, Pensun IJ, Brosky ME, Fines C, Hodges JS, DeLong R, Lai JH. Clinical evaluation of a new resilient denture liner. Part I: Compliance and color evaluation. *J Prosthodontics*. 2003; 12:82-9.
32. Watamoto T, Samaranayake LP, Jayatilake JA, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ. Effect of filamentation and mode of growth on antifungal susceptibility of *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34(4):333-9.
33. Zaremba ML, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Kierklo A, Tokajuk G *et al*. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. *Adv Med Sci*. 2006; 51(1):233-6.
34. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M *et al*. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol*. 2011; 49(2):208-11.

Anexo 1 - Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba

	<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</p>	
<h3>CERTIFICADO</h3>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Ação do ácido undecilênico liberado por material reembasador resiliente sobre a bioatividade, bioarquitetura e fatores de virulência do biofilme de Candida albicans e Candida glabrata", protocolo nº 082/2010, dos pesquisadores Altair Antoninha Del Bel Cury, Letícia Machado Gonçalves e Wander José da Silva, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 04/08/2010.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Influence of undecylenic acid released from denture liners on bioactivity, bioarchitecture and virulence of Candida albicans and Candida glabrata biofilms", register number 082/2010, of Altair Antoninha Del Bel Cury, Letícia Machado Gonçalves and Wander José da Silva, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 08/04/2010.</p>		
	<p>Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP</p>	
<p>Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP</p>		
<p><small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p>		

Anexo 2 – Ilustrações dos materiais e métodos



Figura 1. Materiais reembasadores resilientes utilizados. A) Dentu-soft (grupo controle, DMG, Medrano SA, Argentina). B) Coe-soft (grupo experimental, GC America, Alsip, IL, USA).

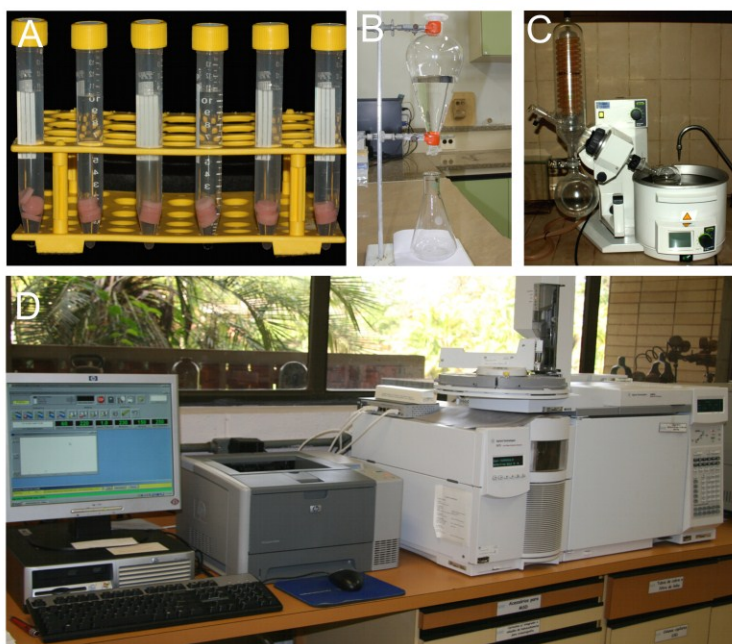


Figura 2. Cinética de liberação *in vitro* do AUD a partir do material reembasador. A) Corpos-de-prova imersos em saliva artificial. B) Saliva artificial e acetato de etila adicionados ao funil de separação. C) Concentração da amostra utilizando rotaevaporador. D) Cromatógrafo gasoso utilizado nas análises.

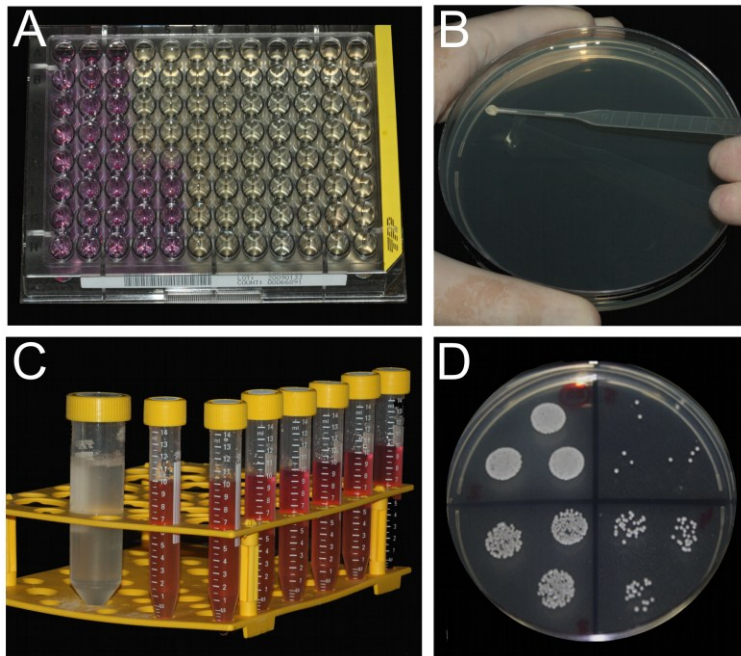


Figura 3. Testes de susceptibilidade de *Candida* ao AUD. A) Placa de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). B) Subcultivo em placas de ágar Sabouraud dextrose (SDA) para determinação da concentração fungicida mínima (CFM). C) *Candida* cultivada em meio RPMI 1640 para o teste de time-kill. D) Placa de SDA com células viáveis para o teste de time-kill.

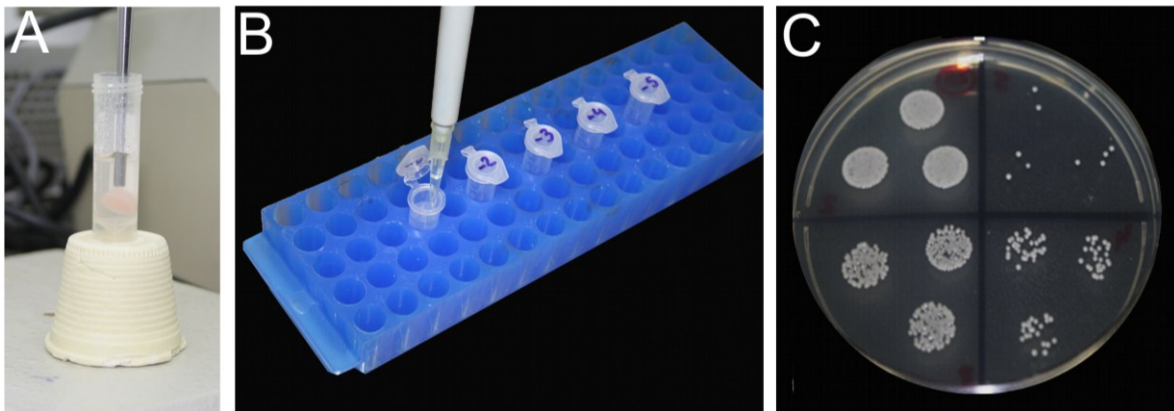


Figura 4. Análise da contagem celular dos biofilmes de *Candida*. A) Desagregação dos biofilmes em sonicador. B) Diluição decimal seriada da suspensão desagregada. C) Placa de SDA para contagem de células viáveis.

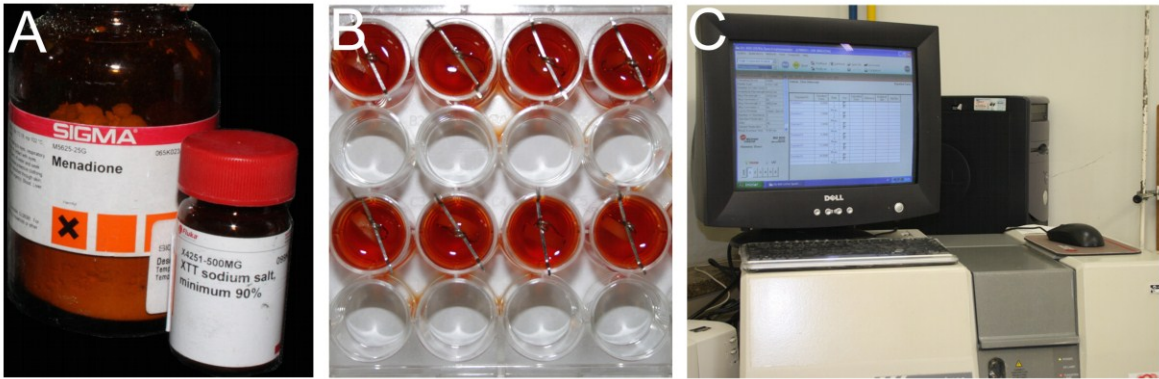


Figura 5. Análise da atividade metabólica dos biofilmes de *Candida*. A) Sal de XTT e menadiona. B) Solução de XTT após oxidação mitocondrial. C) Leitura da alteração colorimétrica em espectrofotômetro.

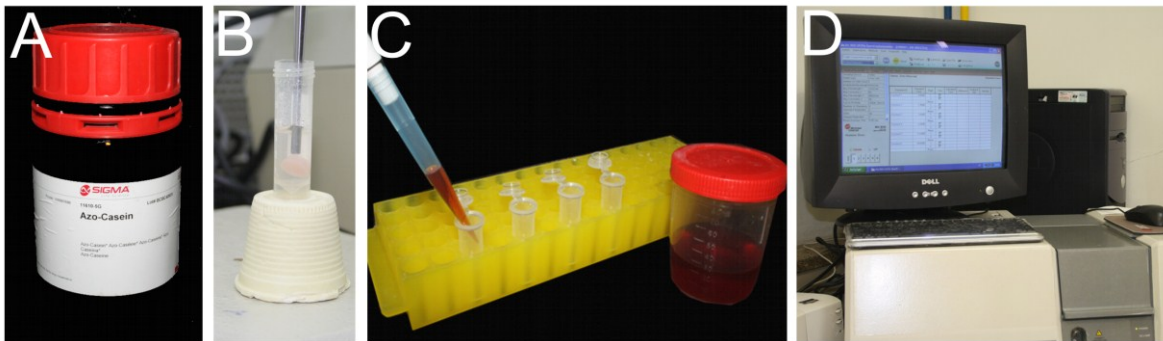


Figura 6. Análise da atividade da enzima proteinase dos biofilmes de *Candida*. A) Azocaseína para preparo do substrato de reação. B) Desagregação dos biofilmes em sonicador. C) Substrato de reação adicionado ao sobrenadante dos biofilmes. D) Leitura da alteração colorimétrica em espectrofotômetro.

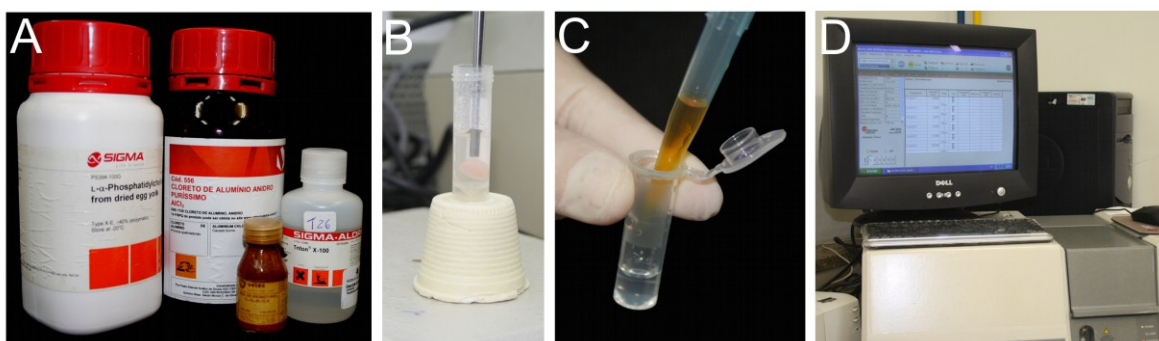


Figura 7. Análise da atividade da enzima fosfolipase dos biofilmes de *Candida*. A) Fosfatidilcolina, cloreto de alumínio, Triton-X e azul de bromotimol para preparo do substrato de reação. B) Desagregação dos biofilmes em sonificador. C) Substrato de reação adicionado ao sobrenadante dos biofilmes. D) Leitura da alteração colorimétrica em espectrofotômetro.

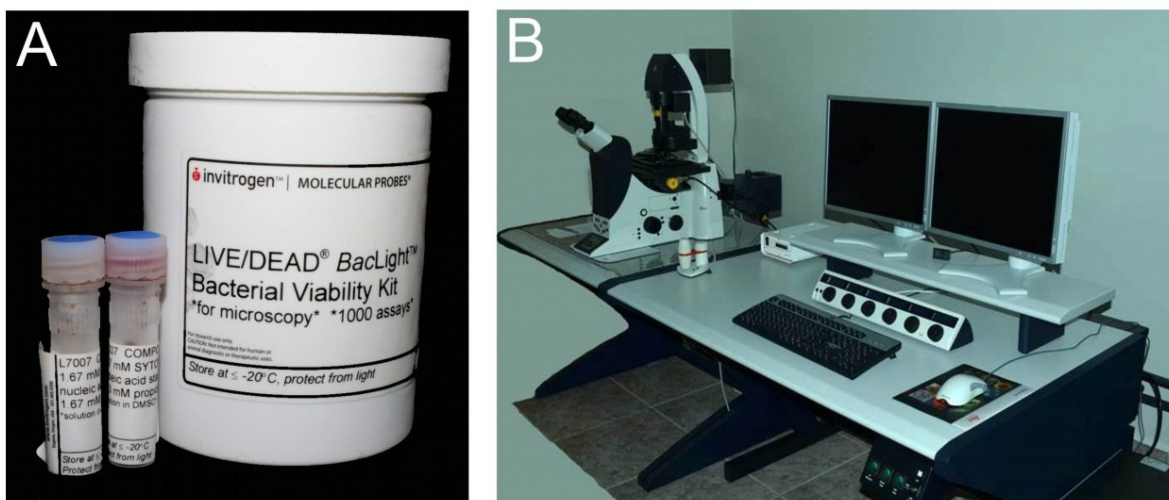


Figura 8. Análise da estrutura dos biofilmes de *Candida* através de microscopia confocal. A) Corante Molecular Probe's Live/Dead BacLight viability kits. B) Microscópio confocal a laser.

Anexo 3 – Comprovante de submissão do artigo

Journal of Dental Research

Edit Account Instructions & Forms Log Out Online Help

SAGE track Powered by SCHOLARONE Manuscripts

Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation

You are logged in as Leticia Gonçalves

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Dental Research*.

Manuscript ID: JDR-12-0378

Title: Effects of undecylenic acid released from denture liner on Candida biofilms

Authors: Gonçalves, Leticia
Del Bel Cury, Altair
Sartoratto, Adilson
Rehder, Vera Lucia
Silva, Wander

Date Submitted: 26-Apr-2012

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.8.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter