

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MATHEUS JACOBINA ANDRADE E SILVA

**Formação de biofilme de *Candida albicans* na superfície de
uma resina acrílica termopolimerizável tratada com
polimento líquido**

BAURU
2012

MATHEUS JACOBINA ANDRADE E SILVA

**Formação de biofilme de *Candida albicans* na superfície de
uma resina acrílica termopolimerizável tratada com
polimento líquido**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

Versão Corrigida

BAURU
2012

J15f Jacobina, Matheus
 Formação de biofilme de *Candida albicans* na
superfície de uma resina acrílica
termopolimerizável tratada com polimento líquido.
/ Matheus Jacobina Andrade e Silva. – Bauru,
2012.
 106p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais que sempre recebi;

A minha irmã, Marília, por seu carinho;

Ao meu avô Jaime, por seu exemplo e conselhos;

Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter dado forças para enfrentar e superar os desafios e dificuldades que aconteceram durante esta caminhada.

Aos meus pais, pelo amor e suporte incondicional, em todos os momentos e circunstâncias; sem vocês esta vitória não seria possível. Dedico ela a vocês!

Aos parentes e amigos que mesmo de longe mostraram-se solidários e presentes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, um exemplo de profissional e de ser humano. Muito obrigado pelos ensinamentos e principalmente pela paciência e apoio nos momentos de turbulência!

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, representada por seu Diretor Prof. Dr. José Carlos Pereira, e à sua Comissão de Pós-Graduação, representada pelo Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.

Aos professores do Departamento de Prótese desta Faculdade, Prof. Dr. Accácio Lins do Valle, Prof. Dr. Carlos Dos Reis Pereira de Araújo, Prof. Dr. Gerson Bonfante, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Profa. Dra. Karin H. Neppelenbroek, Profa. Dra. Lucimar Falavinha, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, Prof. Dr. Paulo Martins Ferreira, Prof. Dr. Pedro César Garcia e Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela, pelos ensinamentos enriquecedores.

A Profa. Dra Ana Carolina Magalhães e Larissa Grizzo do Departamento de Bioquímica, pela ajuda com as discussões sobre saliva artificial e utilização do espectrofotômetro. Muito obrigado!

Aos colegas de mestrado, Ana Sílvia, Carol, Eloisa, Fernanda, Hugo, Livia Aguiar, Livia Lopes, Livia Maria, Luana, Luiz, Max Dória, Max Laurent, Mônica, Mírian e Vitor pela agradável convivência, amizade e ajuda mútua.

Aos colegas do Doutorado, Bruno, Daniel Sartorelli, Daniel Lanza, Fábio, Marcelo, Marcela, Murilo Auller, Paulo, Priscila e Vinícius. Meu obrigado pelas conversas e considerações feitas durante os debates dos seminários.

Aos colegas do grupo de pesquisa que contribuíram para o desenvolvimento da nossa linha atual, Emilio, Flora, Luciana e Paulo. Muito obrigado pelo legado deixado, ajuda e ensinamentos transmitidos. Também, a Denise Gusmão, colega recém-chegada, que já demonstrou solicitação a ajudar e engrandecer nosso grupo.

Aos funcionários do Departamento de Prótese Dentária, Marcelo Giatti, Reivanildo, Walquíria, Cláudia e Débora, pela eficiência e disponibilidade.

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), Dona Neusa, Márcia, Marcelo e Rafaela pela ajuda e prestatividade para a realização dos experimentos. Também a Renato Murback, pelas ideias e ajuda no desenvolvimento do dispositivo para polimento utilizado neste trabalho.

Às funcionárias da Clínica de Pós-graduação, Cleusa e Hebe, pelo seu bom humor e carinho.

Ao funcionário do Departamento de Endodontia, Edimauro de Andrade, pela importante ajuda na aquisição das imagens no MEV.

A Ronald Ordinola, aluno de Doutorado do Departamento de Endodontia, pela ajuda e esclarecimentos da análise estatística.

À ACECIL, por realizar a esterilização dos corpos de prova desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido, fundamental para conclusão deste curso.

As pessoas que fazem ou fizeram parte da minha vida e contribuíram, à sua maneira, para o meu crescimento intelectual e pessoal. A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

Resumo

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar a formação de biofilme de *Candida albicans* e avaliar a integridade da superfície de uma resina acrílica termopolimerizável tratada com os sistemas de polimento líquido Biscover LV (Bisco, Schaumburg, USA) e Surface Coat (Kuraray, Tokyo, Japan), após 30 e 90 ciclos de desinfecção química. Um total de 280 corpos de prova (10 X 10 X 2 mm) foram confeccionados, esterilizados e aleatoriamente divididos em 20 grupos (n=14), de acordo com o tipo de polimento (mecânico de 0,3 ou 3 µm, Surface Coat e Biscover LV), número de ciclos testados (0, 30 e 90) e solução utilizada: Nenhuma (controle negativo), Hipoclorito de sódio 1% (experimental) e água destilada (controle positivo). Após exposição às respectivas soluções de acordo com o protocolo adotado, as amostras foram imersas em saliva artificial por 2 h para a formação da película adquirida salivar e então inoculadas com 2 mL de suspensão de *C. albicans* (1.10^7 cel/mL) para fase de adesão durante 90 min. Após esta fase, as amostras foram lavadas e imersas em TSB estéril por 24 h para crescimento do biofilme em estufa a 37°C sob agitação. Para quantificação do biofilme, foi utilizado o método de coloração por Cristal Violeta, em 240 espécimes divididos em 20 grupos de 12 amostras cada. Esta análise foi realizada por espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm para mensuração do nível de absorbância do sobrenadante obtido após a descoloração do biofilme. Para análise qualitativa da integridade da camada de polimento líquido, 2 amostras de cada grupo (uma contaminada e outra não) tiveram suas superfícies fotografadas em seis campos distintos através do microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os resultados foram submetidos o teste paramétrico ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$). Comparando os tipos de tratamentos de superfície avaliados dentro do mesmo tempo e soluções testadas não pode-se notar diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 0,3 µm e Biscover LV ou 3 µm e Surface Coat quando comparados entre si. Porém quando comparados os grupos de 0,3 µm e Biscover LV aos grupos de 3 µm e Surface Coat, estes apresentaram diferença estatisticamente significativa. A análise em MEV dos corpos de prova colonizados demonstrou a presença de *C. albicans* na superfície do corpo de prova sob a forma de leveduras e hifas em todos os grupos, enquanto que

nos não colonizados foi observada uma degradação progressiva em todos os tipos de tratamento de superfície a medida que os números de ciclos e os desafios químicos eram aumentados. Apesar disso, o grupo Biscover LV apresentou uma quantidade de biofilme formada compatível com uma superfície lisa (0,3 μm), enquanto que Surface Coat apresentou quantidade de biofilme formada compatível com a superfície rugosa (3,0 μm).

Palavras-chave: *Candida albicans*; Desinfecção; Polidores; Prótese total.

Abstract

ABSTRACT

***Candida albicans* biofilm formation on surface of an denture base resin treated with liquid-polish.**

The aim of this study was to quantify *Candida albicans* biofilm formation and evaluate the surface integrity of an denture base resin treated with liquid-polish Biscover LV (Bisco, Schaumburg, USA) and Surface Coat (Kuraray, Tokyo, Japan), after 30 and 90 cycles of chemical disinfection. A total of 280 specimens (10 x 10 x 2 mm) were prepared, sterilized and randomly divided into 20 groups (n = 14), according to the type of polishing (mechanical 0.3 or 3 µm, Surface Coat and Biscover LV), number of cycles tested (0, 30, 90) and the solution used: none (negative-control), 1% sodium hypochlorite (experimental) and distilled water (positive-control). After exposure to the respective solutions according to the protocol adopted, the samples were immersed in artificial saliva for 2 h to form the acquired salivary pellicle and then inoculated with 2 mL of *C. albicans* (1.10^7 cel / mL) for 90 min to adhesion. After this, samples were washed and immersed in TSB for 24 h to biofilm growth at 37°C. For biofilm quantification, the method of crystal violet staining was used in 240 specimens, divided into 20 groups of 12 samples each. This analysis was performed by a spectrophotometer at a wavelength of 595 nm by measuring the level of supernatant's absorbance obtained after the biofilm's stain release. For qualitative analysis of the integrity of the liquid-polish layer, two samples from each group (one colonized and one not) had their surfaces photographed in six different fields through the scanning electron microscope (SEM). The results were submitted to ANOVA followed by Tukey's test (p<0.05). Comparing the types of surface treatments evaluated, within the same time and tested solutions, can not be noted statistically significant difference between groups of 0.3 µm and Biscover LV or 3 µm and Surface Coat. But when comparing the groups of 0.3 µm and Biscover LV to groups of 3 mm and Surface Coat, there was a statistically significant difference. SEM analysis of the colonized specimens demonstrated the presence of *C. albicans* in the form of yeast and hyphae in all groups. In not colonized surfaces a progressive degradation was observed that was bigger when the number of cycles and chemical challenges were increased. Nevertheless, the group Biscover LV showed a amount of biofilm similar to a smooth surface (0.3 µm), while Surface Coat presented an amount compatible with the roughened surface (3.0 µm).

Keywords: *Candida albicans*; Disinfection; Liquid-polish; Denture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Confecção dos padrões de silicone	31
Figura 2	- Inclusão dos padrões de silicone	33
Figura 3	- Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento	35
Figura 4	- Dispositivo de resina acrílica em forma de disco adaptado	36
Figura 5	- Padronização e aferição da rugosidade superficial	37
Figura 6	- Aplicação dos sistemas de polimento líquido	38
Figura 7	- Desinfecção com hipoclorito de sódio 1%	41
Figura 8	- Imersão em saliva artificial.....	42
Figura 9	- Fase de adesão de <i>C. albicans</i>	43
Figura 10	- Formação de biofilme de <i>C. albicans</i>	44
Figura 11	- Coloração com Cristal Violeta e obtenção do sobrenadante.....	45
Figura 12	- Leitura do sobrenadante (absorbância).....	46
Figura 13	- Processamento das amostras para MEV.....	47
Figura 14	- Sequência padrão da análise de campos.....	48
Figura 15	- Grupo controle negativo - Rugosidade média de 3 µm	52
Figura 16	- Grupo controle de 30 ciclos - Rugosidade média de 3 µm	53
Figura 17	- Grupo controle de 90 ciclos - Rugosidade média de 3 µm	53
Figura 18	- Grupo hipoclorito 1% de 30 ciclos - Rugosidade média de 3 µm	54
Figura 19	- Grupo hipoclorito 1% de 90 ciclos - Rugosidade média de 3 µm	55
Figura 20	- Grupo controle negativo - Biscover LV	57
Figura 21	- Grupo controle de 30 ciclos - Biscover LV	58
Figura 22	- Grupo controle de 90 ciclos - Biscover LV	58
Figura 23	- Grupo hipoclorito 1% de 30 ciclos - Biscover LV	59
Figura 24	- Grupo hipoclorito 1% de 90 ciclos - Biscover LV	60
Figura 25	- Grupo controle negativo - Surface Coat.....	62
Figura 26	- Grupo controle de 30 ciclos - Surface Coat	63
Figura 27	- Grupo controle de 90 ciclos - Surface Coat	63
Figura 28	- Grupo hipoclorito 1% de 30 ciclos - Surface Coat	64

Figura 29 - Grupo hipoclorito 1% de 90 ciclos - Surface Coat	65
Figura 30 - Grupo controle negativo - Rugosidade média de 0,3 μm	67
Figura 31 - Grupo controle de 30 ciclos - Rugosidade média de 0,3 μm	68
Figura 32 - Grupo controle de 90 ciclos - Rugosidade média de 0,3 μm	68
Figura 33 - Grupo hipoclorito 1% de 30 ciclos - Rugosidade média de 0,3 μm	69
Figura 34 - Grupo hipoclorito 1% de 90 ciclos - Rugosidade média de 0,3 μm	70
Figura 35 - Grupos controle negativo - Todas superfícies	72
Figura 36 - Grupos controle de 30 ciclos - Todas superfícies	72
Figura 37 - Grupos controle de 90 ciclos - Todas superfícies	72
Figura 38 - Grupos hipoclorito 1% de 30 ciclos - Todas superfícies	73
Figura 39 - Grupos hipoclorito 1% de 90 ciclos - Todas superfícies	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos.....	39
Tabela 2 - Fórmula da saliva artificial.....	41
Tabela 3 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos das amostras com rugosidade média de 3,0 μm	51
Tabela 4 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos das amostras tratadas com Biscover LV	56
Tabela 5 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos das amostras tratadas com Surface Coat	61
Tabela 6 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos das amostras com rugosidade média de 0,3 μm	66
Tabela 7 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos dos grupos com mesmo número de ciclos e soluções testadas	71

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>et al.</i>	<i>e colaboradores</i>
PMMA	Polimetilmetacrilato
MEV	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>
PBS	<i>(Phosphate Buffer Solution) Solução de Tampão Fosfato</i>
TSB	<i>(Tryptic Soy Broth) Caldo de Soja Trípico</i>
CV	<i>Cristal Violeta</i>
LV	<i>(Low Viscosity) Baixa viscosidade</i>
spp	Espécies
%	Porcentagem
nm	Nanômetros
mm	Milímetro
Cm^2	<i>Centímetro quadrado</i>
μm	Micrometro
μg	<i>Micrograma</i>
μl	<i>Microlitro</i>
Ra	<i>Unidade de medida de rugosidade superficial</i>
Kg	Quilos
g	Gramas
Kgf	<i>Quilograma força</i>
mL	<i>Mililitro</i>
Cels/mL	<i>Células por mililitro</i>
mW	<i>Miliwatts</i>
mg/L	<i>Miligramas por litro</i>
°	<i>Grau</i>
°C	<i>Grau centígrados</i>
v/v	<i>Volume por volume</i>
M	<i>Molar</i>
h	<i>Hora(s)</i>
min	<i>Minuto(s)</i>
s	<i>Segundo(s)</i>
pH	<i>Potencial hidrogeniônico</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1	Rugosidade Superficial	15
1.2	Patologia em Idosos.....	16
1.3	Estomatite por Prótese Total.....	17
1.4	Formação de Biofilme	18
1.5	Sistemas de Polimento Líquido.....	21
1.6	Hipoclorito de Sódio	23
2	PROPOSIÇÃO	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Confecção das amostras.....	31
3.1.1	Confecção dos padrões de silicone	31
3.1.2	Inclusão dos padrões de silicone	32
3.1.3	Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento.....	33
3.1.4	Polimento mecânico.....	35
3.1.5	Aferição da padronização da rugosidade superficial.....	37
3.1.6	Polimento Líquido.....	38
3.2	Distribuição dos grupos.....	39
3.3	Desinfecção com hipoclorito de sódio 1%.....	40
3.4	Imersão em saliva artificial.....	41
3.5	Inoculação dos espécimes	42
3.6	Formação de biofilme.....	43
3.7	Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta	44
3.8	Análise qualitativa com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
3.8.1	Processamento das amostras para MEV.....	46
3.8.2	Análise dos corpos de prova através do MEV	47
3.9	Análise estatística	48

4	RESULTADOS.....	49
4.1	Grupos com rugosidade média de 3,0 μm	51
4.1.1	Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta	51
4.1.2	Análise qualitativa da camada superficial com MEV	52
4.2	Grupos com o sistema de polimento líquido Biscover LV	56
4.2.1	Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta	56
4.2.2	Análise qualitativa da camada superficial com MEV	57
4.3	Grupos com o sistema de polimento líquido Surface Coat	61
4.3.1	Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta	61
4.3.2	Análise qualitativa da camada superficial com MEV	62
4.4	Grupos com rugosidade média de 0,3 μm	66
4.4.1	Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta	66
4.4.2	Análise qualitativa da camada superficial com MEV	67
4.5	Grupos por mesmo numero de ciclos e soluções testadas.....	71
4.5.1	Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta	71
4.5.2	Análise qualitativa da camada superficial com MEV	72
5	DISCUSSÃO	75
5.1	Discussão do materiais e métodos	77
5.2	Discussão dos resultados	82
6	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS.....	91

1 Introdução e **S**íntese **B**ibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

As próteses totais podem ser consideradas como o principal recurso para reabilitar pacientes totalmente desdentados. Elas são constituídas de dentes artificiais suportados por uma base composta basicamente de polimetilmetacrilato (PMMA) e é responsável pela estabilidade, retenção e distribuição das forças mastigatórias ao rebordo subjacente.

Esta base idealmente deve ter uma superfície lisa e polida para manter o conforto e saúde dos tecidos orais, minimizar a colonização de microrganismos e o acúmulo de biofilme. (AL-RIFAIY, 2009)

1.1 Rugosidade Superficial

A superfície interna da prótese deve copiar todas as características do palato duro, o que resulta numa superfície irregular e rugosa, que está em íntimo contato com os tecidos de suporte e não é passível de ser polida. Dessa forma, a dentadura pode se tornar um reservatório de infecção (BAYSAN *et al.*, 1998; LONEY *et al.*, 2000; SAMARANAYAKE *et al.*, 1980; WATERS *et al.*, 1997) uma vez que a presença de irregularidades e uma rugosidade elevada funcionam como nichos para o abrigo microbiano, aumentando a probabilidade destes microrganismos permanecerem nesta superfície mesmo depois de serem limpas (AL-RIFAIY, 2009).

Diversos estudos associam a rugosidade como um fator preponderante a adesão de microrganismos (ULUSOY *et al.*, 1986; QUIRYNEN *et al.*, 1990; VERRAN e MARYAN, 1997; BOLLEN *et al.*, 1997). A rugosidade pode ser mensurada através do Ra, que é a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média do percurso de medição, expressa em micrometros (μm) (RADFORD, 1999; VERRAN e MARYAN, 1997).

Em um estudo, Quirynten *et al.* (QUIRYNEN *et al.*, 1990), observaram que espécimes de resina acrílica com valores de rugosidade superficial de $0,12 \mu\text{m}$ tiveram uma reduzida colonização bacteriana quando comparados com superfícies de $0,2 \mu\text{m}$. Foi então observado que este valor seria o limiar de adesão de

microrganismos, devendo então, preferencialmente, as superfícies obterem uma rugosidade inferior a esta. Porém, durante o sistema de polimento convencional de próteses em laboratório, através de sequências de lixa, pastas profiláticas e feltros, as superfícies dessas áreas possuem valores superiores, variando de 0,3 a 0,75 μm (QUIRYNEN *et al.*, 1990; BUSSCHER *et al.*, 1984). Foi notado também, que regiões em que a rugosidade era superior a 2 μm , um aumento significativo de biofilme ocorreu (QUIRYNEN *et al.*, 1990; RADFORD, 1999).

Reforçando esta idéia, em outro estudo, Nevzatoğlu *et al.* (2007), avaliaram a rugosidade superficial e a aderência de *C. albicans* em resinas acrílicas para base de dentadura e reembasadores resilientes com diversos tipos de acabamento da superfície: vidro, gesso e broca de tungstênio. Após a mensuração com um rugosímetro a laser, observaram, de um modo geral, que as bases de resina acrílica apresentaram menor rugosidade que as bases resilientes e que valores menores na adesão de *C. albicans* foram encontrados nas superfícies processadas com vidro, enquanto que os maiores valores foram encontrados nas superfícies processadas brocas de tungstênio, que não diferiu estatisticamente das superfícies dos espécimes processados com gesso. (NEVZATOĞLU *et al.*, 2007)

Sendo assim, como a superfície interna da prótese total não é passível de ser polida mecanicamente, pode ser considerada uma área crítica para o desenvolvimento de processos patológicos, por estarem em íntimo contato com os tecidos de suporte e sua topografia promover um aumento da área e nichos de retenção que favorecem a aderência de microrganismos e a formação de biofilme (AL-RIFAIY, 2009; SHAY, 2000), sendo um fator de risco para idosos e pacientes imunodeprimidos (KLEIN *et al.*, 1984; GREENSPAN; GREENSPAN, 1987; SCHMID *et al.*, 1992).

1.2 Patologia em Idosos

A prevalência do uso de próteses totais aumenta com a idade, assim como também há um aumento do risco de complicações da saúde geral (YONEYAMA *et al.*, 2002). Pessoas idosas correm um maior risco de desenvolver doenças bucais, devido a hipossalivação decorrente da idade ou causada pelos inúmeros medicamentos que comumente são utilizados para tratar doenças. A diminuição do

fluxo salivar torna os tecidos orais e de suporte mais vulneráveis aos agentes nocivos e mais suscetíveis ao trauma mecânico (NARHI *et al.*, 1993), aumentando o risco de infecções fúngicas e o desenvolvimento de cânceres bucais (SILVERGLADE; STABLEIN, 1988).

Outra preocupação pertinente é em relação aos hábitos de higiene oral nesta faixa etária. Sua capacidade de higiene é consideravelmente comprometida quando se compara às gerações mais jovens, devido a diminuição da acuidade visual, atenção e coordenação motora. Em um estudo que determinou hábitos de saúde bucal dos idosos, constatou-se que 91-96% dos 303 indivíduos acima de 60 anos necessitavam de melhorias nos seus hábitos de higiene (BERGMAN *et al.*, 1991). Diversos estudos demonstraram que com o avanço da idade há um aumento da prevalência de infecção por *C. albicans* e da higienização deficiente (BUDTZ-JORGENSEN *et al.*, 2000; HOAD-REDDICK; GRANT; GRIFFITHS, 1990;).

Alterações na saúde geral e o estado de comprometimento do sistema imunológico, associado a uma má higiene da prótese, levam à uma manifestação de patógenos oportunistas, como a *C. albicans*, principal responsável pela estomatite sobre prótese total (WILLIAMS *et al.*, 1997).

1.3 Estomatite sobre Prótese Total

A estomatite sobre prótese total ou candidíase atrófica crônica são termos utilizados na literatura para definir um processo inflamatório da mucosa oral associada à utilização de prótese total removível (SAMARANAYAKE; *et al.*, 2009; LOMBARDI; BUDTZ-JORGENSEN, 1993). É a forma de candidíase mais comum e atinge 11 a 67% dos usuários de dentadura (ARENDORF; WALKER, 1987), sendo mais frequente na mucosa do palato (OLSEN, 1974).

Sua etiologia é de origem multifatorial, conforme explicada por Arendorf e Walker que relata que a infecção bacteriana, a irritação mecânica, o uso contínuo da dentadura, a higiene oral deficiente, os fatores associados com a dieta, a reação alérgica aos materiais de confecção da prótese e condições sistêmicas predisponentes podem vir acompanhados da presença de *Candida* spp. no aparecimento da doença (ARENDORF; WALKER, 1987). Raramente a doença se

apresenta sem a presença de pelo menos um fator predisponente que diminua a resistência do indivíduo (IACOPINO; WATHEN, 1992).

Existem diversas propostas de diferentes autores (BERGENDAL, 1982; BERGENDAL; ISACSSON, 1983; BUDTZ-JORGENSEN, 1970) para a classificação das diferentes formas de estomatite por prótese total. Uma das mais difundidas é a classificação de Newton, (NEWTON, 1962). Assim, segundo Newton, a estomatite por prótese total possui 3 tipos:

Tipo I: refere-se ao estágio inicial, onde se apresentam pontos hiperêmicos localizados.

Tipo II: considerada a mais comum dos tipos de estomatite, apresenta-se como um eritema difuso e edema da superfície mucosa. É demarcada pela área marginal da prótese. A condição não é dolorosa e pode se associar a queilite angular.

Tipo III: acredita-se que é desenvolvida a partir de uma estomatite tipo II não tratada por um longo período. Apresenta-se como uma região hiperplásica resultando numa lesão nodular associada a áreas atróficas, referidas como hiperplasia papilar.

O tipo I está relacionado principalmente a traumas localizados, de origem protética, que associado ao acúmulo de biofilme (bacteriano ou fúngico) na superfície interna da prótese total e a mucosa subjacente, poderia desencadear um quadro patológico difuso (Newton II e III) (ARENDORF; WALKER, 1979; BUDTZ-JORGENSEN, 1974).

1.4 Formação de Biofilme

O biofilme é uma comunidade estruturada de células de microrganismos, embebida em uma matriz polimérica extracelular e aderente a uma superfície inerte ou viva formando uma estrutura tridimensional (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006).

Na boca, essas células se aderem a mucosa ou a base da dentadura, intermediadas por uma fina camada protéica derivada da saliva, denominada película adquirida salivar, capaz de modificar as características superficiais dos substratos (YILDIRIM *et al.*, 2005).

O processo de adesão é um mecanismo complexo, influenciado principalmente pelo meio exposto, virulência do patógeno e pelas características da superfície que será colonizada (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 1998; GRUBER *et al.*, 2001; OKITA *et al.*, 1991; RADFORD *et al.*, 1998; SAMARANAYAKE *et al.*, 1980; ZIZIS *et al.* 2000). Dentre as características das superfícies de PMMA que favorecem a adesão de *C. albicans* podemos citar a hidrofobicidade, rugosidade superficial (MINAGI *et al.*, 1985; NIKAWA *et al.*, 1993; RADFORD *et al.*, 1998; SAMARANAYAKE *et al.*, 1980; ZIZIS *et al.* 2000) e adsorção de proteínas salivares (EDGERTON *et al.* 1993; RADFORD *et al.*, 1998; SAMARANAYAKE *et al.*, 1980).

Consolidada a adesão, os microrganismos começam a produzir a matriz polimérica extracelular; com o amadurecimento do biofilme, sua estrutura possui uma arquitetura característica que possibilita uma maior facilidade de captação de nutrientes, favorecendo um crescimento mais ordenado da comunidade e uma maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e resistência a antimicrobianos (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; KUHN *et al.*, 2002; MUKHERJEE *et al.*, 2005).

A composição do biofilme de *C. albicans* consiste em uma mistura de células hospedeiras, células em forma de leveduras, pseudohifas e hifas, além da matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos. O desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* tem sido estudado por muitos pesquisadores e dividido em três fases de desenvolvimento (CHANDRA *et al.*, 2001; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; TEN CATE *et al.*, 2009):

Fase I (Inicial 1-11 h): Na fase inicial, a célula planctônica na forma de levedura adere na superfície do substrato. Essa aproximação das leveduras no substrato pode ser aleatória ou atraída por uma quimiotaxia. Após a aproximação das células, existe uma interação destas com a superfície, sendo hidrofóbica e eletrostática. A produção de adesinas pela levedura e a aderência de plaquetas e fibrinas do hospedeiro no substrato ajudam ainda mais na adesão primária.

Fase II (Intermediário 12-30 h): Na fase secundária, as células aderidas proliferam formando microcolônias e começam a produzir a matriz extracelular. Neste momento existe o aparecimento de mecanismos de comunicação intercelulares que leva a uma expressão diferencial de genes. Esses genes são responsáveis pela transição de leveduras para hifas, na arquitetura da parede celular e na coesividade do biofilme dada pela matriz.

Fase III (maturação 38-72 h): Por último, quando as células começam a se confluírem, a rede formada começa a ser constituída de uma transição de células diferenciadas em pseudohifas, hifas e leveduras, tudo envolvido pela matriz extracelular polimérica e promovendo um crescimento tridimensional.

Existem diversos métodos que permitem a quantificação do biofilme, tais como o peso seco (KUHNS *et al.*, 2002), unidade formadora de colônia (JIN *et al.*, 2004), microscópio confocal (CHANDRA *et al.*, 2001) e a coloração com Cristal Violeta (LI *et al.*, 2003).

A coloração com Cristal Violeta é um dos métodos mais rápidos para quantificar a biomassa e pode ser utilizado diretamente, sem desorganizar o biofilme, seja ele bacteriano (PITTS *et al.*, 2003) ou fúngico (LI *et al.*, 2003). Esta técnica foi utilizada pela primeira vez por Christensen *et al.* (CHRISTENSEN *et al.*, 1985) para corar as bactérias aderidas a tubos de poliestireno ou placas.

O biofilme a ser quantificado é previamente imerso em metanol, promovendo a sua fixação à amostra, que então é corada com Cristal Violeta (corante catiônico) e gentilmente lavada para remoção do excesso; em seguida, o corante que foi difundido ao biofilme é descorado com ácido acético ou álcool, resultando no sobrenadante. A quantificação da biomassa é determinada através de um método fotolorimétrico, a partir da absorbância da solução de metanol resultante do processo de descoloração (STEPANOVIC *et al.* 2000; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008, LI *et al.*, 2003).

O método fotolorimétrico foi desenvolvido com a finalidade de dosar substâncias biológicas. Neste método são utilizadas reações que resultam em soluções coloridas. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração da substância que está sendo dosada (BECKETT; STENLAKE, 1988).

A diferença de coloração é muitas vezes imperceptível a olho nu. A medida da intensidade de cor é efetuada por instrumentos denominados fotolorímetros ou espectrofotômetros. Estes instrumentos possuem uma fonte de luz branca, filtros coloridos (fotolorímetro), prismas ou retículos de difração (espectrofotômetro), através dos quais pode ser feita a seleção do comprimento de onda e, um sistema onde a intensidade da luz é detectada, transformada em corrente elétrica, amplificada e medida (BECKETT; STENLAKE, 1988).

Ao incidir um feixe de luz sobre uma solução corada, verifica-se que a intensidade de luz que emerge da solução é menor que a intensidade de luz

incidente nesta solução. A diferença entre a intensidade de luz que incide e a intensidade de luz que atravessa a solução corada pode ser medida e expressa pelo coeficiente obtido através da divisão da intensidade da luz, emergente pela intensidade da luz incidente. Este coeficiente é chamado de transmitância. Por sua vez, mede-se a intensidade de luz absorvida por uma solução corada pela redução da medida da intensidade de luz transmitida. A medida de absorção é chamada de absorbância, logo absorbância e transmitância são inversamente proporcionais (BECKETT; STENLAKE, 1988).

Portanto, uma vez aferido, pode-se quantificar o biofilme através da quantidade de luz absorvida pelo corante Cristal Violeta que foi liberado no processo de descoloração. Quanto maior a concentração de Cristal Violeta, mais luz será absorvida e conseqüentemente mais biofilme foi formado (BECKETT; STENLAKE, 1988).

1.5 Sistemas de Polimento Líquido

Os sistemas de polimento líquido mostram-se como uma alternativa interessante para modificar as superfícies internas das bases da dentadura, selando-a com uma espécie de resina fluida fotopolimerizável que não possui inibição por oxigênio, resultando numa película de 10 à 20 µm de espessura, lisa, brilhosa e resistente ao desgaste (SAYINSU *et al.*, 2007).

Em 1986, Budtz-Jorgensen e Kaaber (BUDTZ-JORGENSEN; KAABER, 1986), estudaram “*in vivo*” um sistema de polimento líquido (Perma Link / Perma Cure System, G. C. Internat. Cooperation, Tokyo, Japan) aplicado nas superfícies internas das próteses totais onde observaram uma diminuição do acúmulo de biofilme durante a primeira semana de utilização. Ao final de um mês, os pacientes relataram facilidade durante a limpeza e escovação da superfície aplicada, sendo também observado uma redução nos quadros de estomatite induzida por dentadura. Apesar de ter sido demonstrada a eficiência do polimento líquido, este trabalho possuiu um curto período de avaliação.

Outro tipo de polimento líquido (Palaseal, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) foi avaliado qualitativamente por Sesma *et al.*, (SESMA *et al.*, 2005) a curto e médio prazo. Em um mês, mais uma vez confirmou-se a sua eficácia.

Entretanto, em três meses, os autores observaram uma degradação dessa película, aumentando a adesão de microrganismos em algumas áreas da superfície tratada, devido a presença de microfraturas.

Com a evolução dos compósitos e entre eles os polidores líquidos, foram retomadas as investigações científicas avaliando a nova geração destas substâncias sobre as superfícies de próteses dentárias (OWENS; JOHNSON, 2006; SAYINSU *et al.*, 2007; DAVIDI *et al.*, 2007; DAVIDI *et al.*, 2008; CILLI *et al.*, 2009; BRISO *et al.*, 2011). Davidi *et al.* (DAVIDI *et al.*, 2007), estudaram “in vivo” superfícies de resinas acrílicas tratadas com Biscover e, observou, que estas superfícies acumulavam menos biofilme do que em uma superfície polida mecanicamente ou coberta com adesivo. Para verificar a razão destes resultados, estes mesmos autores realizaram um outro estudo analisando o Biscover em relação a algum poder antimicrobiano, hidrofobicidade, rugosidade superficial e adsorção de proteínas salivares e constataram que este produto não possuía nenhum poder antimicrobiano e que os valores encontrados para hidrofobicidade e rugosidade superficial eram similares a de uma superfície de PMMA polida, com exceção da adsorção de proteínas que apresentou valores insignificantes nas superfícies cobertas com o polimento líquido (DAVIDI *et al.*, 2008).

Apesar das modificações favoráveis na superfície de PMMA, promovidas pela camada de polimento líquido, dificultarem o processo de adesão de microrganismos, isto não é o suficiente para evitar a formação de biofilme. A higienização mecânica com escova e pasta dental, procedimento utilizado por 60 a 90% dos pacientes portadores de dentaduras, é um recurso necessário para a desorganização, controle da placa e manutenção da prótese e dos tecidos de suporte em condições saudáveis (ABELSON, 1985; JAGGER; HARRISON, 1995).

Porém, é reconhecido que este método de higiene não é eficiente na total remoção dos microrganismos aderidos a este substrato, por isso, muitos autores recomendam que se implemente uma associação desta técnica com imersão em soluções desinfetantes, que aumentam a eficácia de ação e são grandes aliadas de pacientes que possuem uma coordenação motora deficiente (ABELSON, 1985; BUDTZ- JORGENSEN, 1979; CHAN *et al.*, 1991; DILLS *et al.*, 1988; LOMBARDI; BUDTZ- JORGENSEN, 1993).

1.6 Hipoclorito de Sódio

Idealmente, uma solução desinfetante deve demonstrar uma atividade de remoção de manchas e de biofilme, com ação antibacteriana e antifúngica, eliminando os patógenos prejudiciais. Deve também ser biocompatível (atóxico), não causar danos as bases da prótese, ser de ação rápida e fácil uso, não possuir sabor e ter baixo custo (FELTON *et al.*, 2011).

Dos desinfetantes disponíveis no mercado, o hipoclorito de sódio é um dos mais amplamente utilizados como método de higiene complementar em prótese total devido a sua ação bactericida e fungicida (VERES *et al.*, 1985), que atua diretamente na matriz orgânica da placa, resultando numa dissolução da estrutura polimérica, provavelmente pela oxidação do conteúdo protéico ou por uma redução da adesão na maioria das espécies de *Candida* spp. (NIKAWA *et al.*, 1999)

O hipoclorito de sódio existe somente em solução aquosa. Neste estado ele origina o hidróxido de sódio (base forte) e o ácido hipocloroso (ácido fraco) (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999). Portanto, a ação desinfetante desta substância deve-se à liberação de cloro. Apesar do hidróxido de sódio gerado pela reação do hipoclorito com a água também apresentar eficácia antimicrobiana, sabe-se que a formação de compostos contendo cloro ativo, como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito, é a principal responsável pela excelente atividade antimicrobiana da solução clorada (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999).

Diversos estudos são realizados buscando determinar a efetividade e concentração do hipoclorito de sódio como agente de desinfecção química (WEBB *et al.*, 1998; PAVARINA *et al.*, 2003; VIANNA *et al.*, 2004; SENA *et al.*, 2006; FALAH-TAFTI *et al.*, 2008). Vianna *et al.*, (VIANNA *et al.*, 2004) realizaram um estudo vendo o tempo máximo de eliminação de microrganismos patógenos, como *C. albicans*, com hipoclorito de sódio nas concentrações: 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%, e observaram que a quanto menor a concentração, maior o tempo necessário para eliminar os patógenos avaliados. Entretanto, apesar deste desinfetante ser mais eficiente em altas concentrações, sabe-se que quando utilizado, principalmente com concentrações acima de 2%, ele é mais danoso a base da prótese, alterando a rugosidade superficial e a coloração (FALAH-TAFTI *et al.*, 2008).

Então, Pavarina *et al.*, (PAVARINA *et al.*, 2003) realizaram um estudo para propor um protocolo para a desinfecção de próteses totais, utilizando hipoclorito de sódio 1%, concluindo que a imersão da prótese nesta solução durante 10 min, demonstrou-se efetiva. Apesar de ser preconizado um tempo curto de exposição da prótese, não é sabido se o uso diário e prolongado deste desinfetante pode afetar as propriedades físico-químicas das resinas para bases de dentadura, inclusive a camada de polimento líquido, o que poderá influenciar na colonização de *C. albicans*.

Sendo assim, considera-se importante avaliar o uso da camada de polimento líquido associado a protocolos de desinfecção química, para verificar a integridade dessa camada e a quantidade de biofilme formado após a simulação de ciclos de desinfecção.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a quantidade da formação de biofilme de *C. albicans* na superfície de uma resina acrílica termopolimerizável, tratada com polimento líquido após 30 e 90 ciclos de desinfecção química, mediante a coloração com Cristal Violeta.
 - Avaliar a integridade da camada de polimento líquido, após 30 e 90 ciclos de desinfecção química através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
-

3 Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Confeção das amostras

3.1.1 Confeção dos padrões de silicone

Para confecção dos padrões de silicone, foi utilizada uma matriz metálica de forma retangular, com dois orifícios medindo 10 mm de comprimento, 10 mm de largura e 2 mm de altura. Os orifícios da matriz foram preenchidos com silicone de condensação de uso laboratorial Zetalabor (Zhermack, Badia Polesine, Italy) e prensada entre duas placas de vidro (JON Com de produtos odontológicos LTDA, São Paulo, Brasil) previamente isoladas com vaselina sólida (Hemafarma Com. e Ind. farmacêutica LTDA, São Gonçalo, Brasil), sob peso de 5 kg, por aproximadamente 10 min. Em seguida, os padrões de silicone foram removidos da matriz e os excessos cortados com auxílio de uma lâmina de bisturi (DE REZENDE PINTO *et al.*, 2009) (Figura 1)

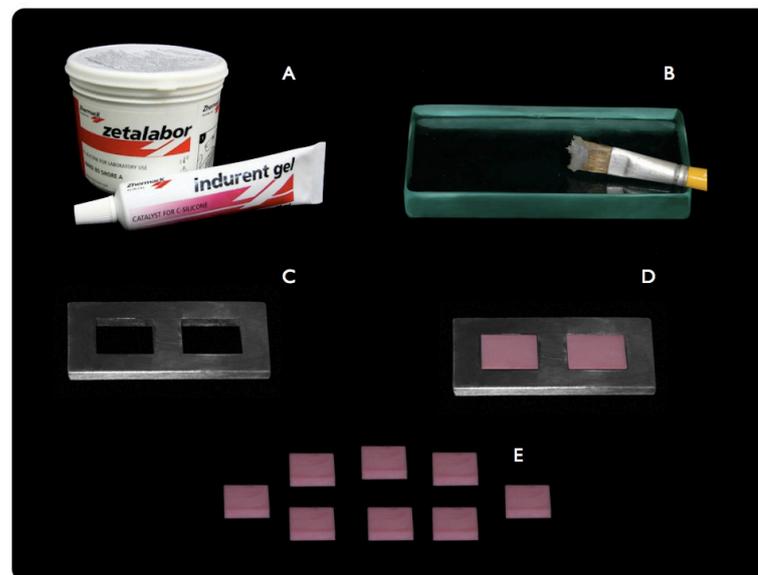


Figura 1: Silicone de condensação de uso laboratorial zetalabor (A). Isolamento com vaselina sólida das placas de vidro (B). Matriz metálica (C). Matriz metálica preenchida com silicone de condensação (D). Padrão de silicone finalizado (E).

3.1.2 Inclusão dos padrões de silicone

Os padrões de silicone obtidos foram incluídos em muflas de latão polido com pino nº 6 (Mac Artigos odontológicos e prótese Ind. e Com. LTDA, São Paulo, Brasil), previamente isoladas com vaselina sólida. Posteriormente, as muflas metálicas foram preenchidas com gesso tipo III (Vigodent S/A Ind. e Com., Rio de Janeiro, Brasil), manipulado e espatulado conforme orientações do fabricante, em cuba de borracha (Dentalbrand Comercial, São Paulo, Brasil) com espátula para gesso (Indusbello Ind. de Instr. Odontológicos, Londrina, Brasil), sob vibração.

Após a presa, os padrões de silicone foram colocados sobre o gesso e uma nova camada deste interposta, a fim de fixar os padrões na mufla. Após o tempo de presa da segunda camada de gesso, foi aplicado o isolante Cel-Lac (S.S. White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, Brasil) em toda superfície. A contramufla também recebeu uma camada de vaselina sólida nas suas superfícies internas, sendo devidamente posicionada e preenchida com gesso tipo III, conforme condições técnicas descritas anteriormente.

As muflas permaneceram na prensa hidráulica (VH Equipamentos médicos Odont. Acess. LTDA., Araraquara, Brasil) com 0,5 Kgf de pressão, por 1 h e, em seguida, abertas para a remoção das matrizes de silicone e realização do exame do molde no gesso, a fim de verificar a presença de bolhas e imperfeições (DE REZENDE PINTO *et al.*, 2009) (Figura 2).

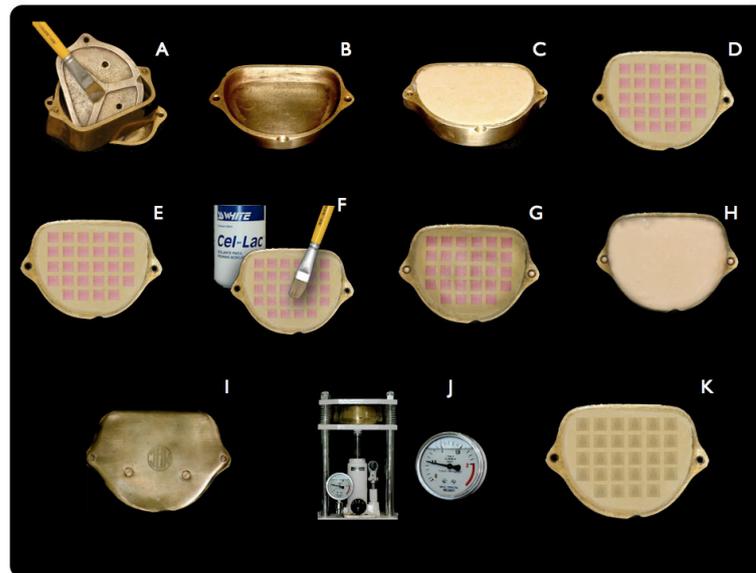


Figura 2: Isolamento da mufla, contramufla e tampa com vaselina sólida (A). Mufla (B). Preenchimento da mufla com gesso tipo III (C) Disposição dos padrões de silicone (D). Padrões de silicone fixados na mufla (E). Isolamento dos padrões de silicone com Cel-lac® (F). Assentamento da contramufla (G). Preenchimento da contramufla com gesso tipo III (H). Colocação da tampa (I). Mufla na prensa hidráulica por 30 min (J). Remoção das matrizes de silicone e exame do molde de gesso (K).

3.1.3 Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento

Para prensagem e confecção dos corpos de prova, foi utilizada a resina acrílica incolor termopolimerizável Lucitone 550 (Dentsply International INC., Chicago, USA), homogeneizada com auxílio de uma espátula n° 31 (SS White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) em recipiente de vidro (Paladon, Pr. Ind. e Comércio de produtos odontológicos, Florianópolis, Brasil), utilizando-se a proporção de 21 g de pó para 10 mL de líquido, conforme orientações do fabricante. O interior dos moldes de gesso recebeu uma camada do isolante Cel-Lac (SS White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, Brasil), com auxílio de um pincel pelo de marta (Condor, n°456, Condor S.A., São Bento do Sul, Brasil) e preenchido com a resina acrílica na fase plástica. A base da mufla foi coberta com uma folha de papel celofane e fechada com a sua respectiva porção superior para ser prensada em prensa hidráulica sob pressão inicial de 0,5 kgf. No momento em que o ponteiro da prensa hidráulica apresentou-se estável, a pressão foi aumentada para 1 kgf e por fim, até atingir 1,5 kgf. Após a estabilização do ponteiro em 1,5 kgf e escoamento completo do excesso da resina acrílica, a mufla foi novamente aberta, o papel

celofane retirado, e a película de resina acrílica excedente removida com o auxílio de uma espátula Lecron (S.S. White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, Brasil). A mufla foi novamente fechada e levada para prensa hidráulica sob pressão de 1,5 kgf durante 30 min (DE REZENDE PINTO *et al.*, 2009).

Decorrido esse período, a mufla foi colocada em uma prensa manual de aço inoxidável (Metal Vander Aparelhos para Ortodontia, Piracicaba, Brasil), e levada à polimerizadora microprocessadora digital, em água, modelo Banho Maria (Solab, Piracicaba, Brasil), para realizar o ciclo de termopolimerização com a seguinte programação: a temperatura da água aqueceu até 73 °C onde manteve-se estável durante 90 min, em seguida, elevou-se até 100 °C, que foram mantidos por mais 30 min. Finalizado o ciclo de termopolimerização, a mufla foi removida da polimerizadora microprocessadora digital após resfriamento completo. Ao final da demuflagem, os corpos de prova de resina acrílica receberam acabamento com o auxílio de uma fresa de tungstênio em baixa velocidade (SARTORI *et al.*, 2006) e foram submetidas a limpeza em ultrassom Ultrasonic Cleaner (Arotec, São Paulo, Brasil) por 20 min (PEREIRA-CENCI *et al.*, 2007) em água destilada, para remoção dos debrís da superfície da resina e, então, aferidos com um paquímetro digital (Starrett, Itu, Brasil) para verificar suas dimensões. Ao final, foram obtidas 280 amostras medindo 10 x 10 x 2 mm (Figura 3).

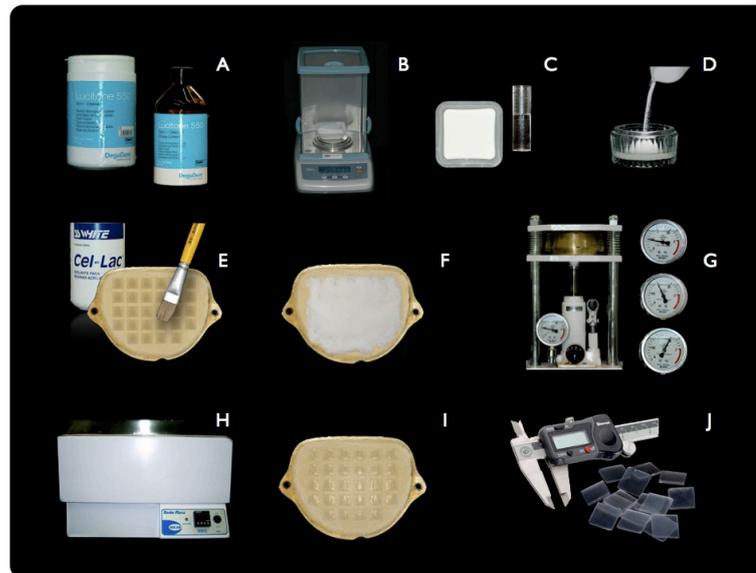


Figura 3: Lucitone 550[®], Incolor (A). Pesagem do acrílico (21 g) em balança digital de precisão (B). Pó e líquido do acrílico (C) Mistura do pó ao líquido do acrílico (D). Isolamento do molde de gesso com Cel-lac[®] (E). Inserção do acrílico na fase plástica no molde de gesso (F). Mufla em prensa hidráulica com pressão de 0,5 1.0 e 1.5 Kgf (G). Termopolimerizadora digital (H). Espécimes após concluído o ciclo de polimerização (I). Eliminação de rebarbas e aferição das dimensões dos espécimes com paquímetro (J).

3.1.4 Polimento mecânico

As amostras obtidas foram levadas a um dispositivo de resina acrílica de forma circular, passível de ser utilizado em politriz metalográfica, que foi modificado, realizando um seccionamento em 4/5 do seu diâmetro, instalando uma placa de aço vazada de 1 mm de espessura em uma das suas superfícies e um parafuso, para fixar e limitar a quantidade de desgaste dos espécimes (Figura 4).

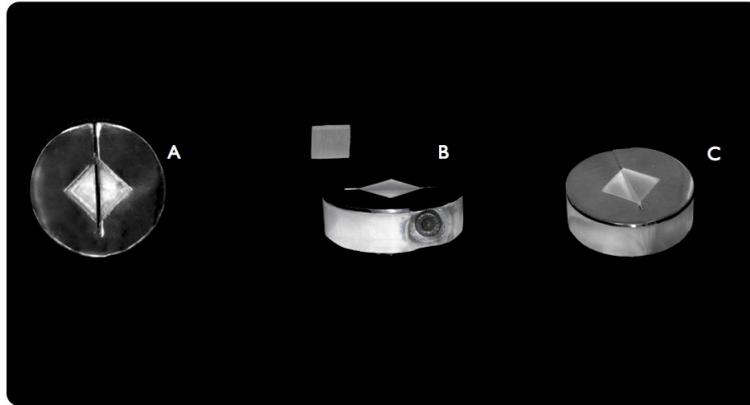


Figura 4: Dispositivo de resina acrílica em forma de disco, adaptado com 4/5 do seu diâmetro seccionado e placa de aço de 1 mm de espessura, vazada nas dimensões do espécime (A). Inserção do espécime no respectivo orifício de fixação (B). Espécime polido com espessura limitada pela placa de aço (C).

O polimento das superfícies das amostras foi realizado em uma politriz metalográfica ER 27000 (Erios, São Paulo, Brasil) com dispositivo para polimentos múltiplos, capaz de polir simultaneamente seis corpos de prova, proporcionando uma padronização de rugosidade e paralelismo entre as superfícies polidas. Do total das 280 amostras, 210 foram aleatoriamente selecionadas e receberam em cada lado, polimento com lixa de silicone carbide (3M, Sumaré, Brasil) de granulação 120, com carga de 260 g durante 20 s, em baixa velocidade e refrigeração abundante, para obter um valor de rugosidade média de 3 μm a fim de simular a superfície interna de uma prótese total. As 70 amostras restantes tiveram ambas faces polidas utilizando uma sequência de lixas de silicone carbide (3M, Sumaré, Brasil) nas granulações 600 e 1200, com carga de 260 g durante 30 s cada, em baixa velocidade e refrigeração abundante, para obter uma superfície com rugosidade média de 0,3 μm , similar à rugosidade encontrada na superfície de espécimes cobertos com polimento líquido (DAVIDI *et al.*, 2008). As lixas foram substituídas a cada seis superfícies polidas e as amostras submetidas à limpeza em ultrassom por 20 min em água destilada (PEREIRA-CENCI *et al.*, 2007), entre as trocas de granulação e/ou ao final do polimento, a fim de remover os grânulos remanescentes.

Então, todos os espécimes foram acondicionados individualmente em poços de placas de cultura de células de 24 poços, contendo 2 mL de água destilada por 12 h a uma temperatura de 37°C, em estufa Orion 502C (Fanem, Guarulhos, Brasil), visando a eliminação de monômero residual (MOURA *et al.*, 2006).

3.1.5 Aferição da padronização da rugosidade superficial

Todas as amostras tiveram suas superfícies mensuradas através do aparelho rugosímetro Surftest SJ-301 (Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan), com a finalidade de verificar a padronização da rugosidade média entre os corpos de prova polidos mecanicamente. Foram realizadas três leituras verticais e horizontais na superfície dos espécimes, sendo considerada a média aritmética (R_a) entre os picos e vales percorridos pela ponta ativa do aparelho, com percurso de medição de 4 mm, comprimento de onda limite de 0,8 mm e velocidade de 0,5 mm/s. Ao final da aferição, foram obtidas 210 amostras com superfícies com valor médio de $3 \mu\text{m}$ e 70 amostras com superfícies com valor médio de $0,3 \mu\text{m}$ (Figura 5).

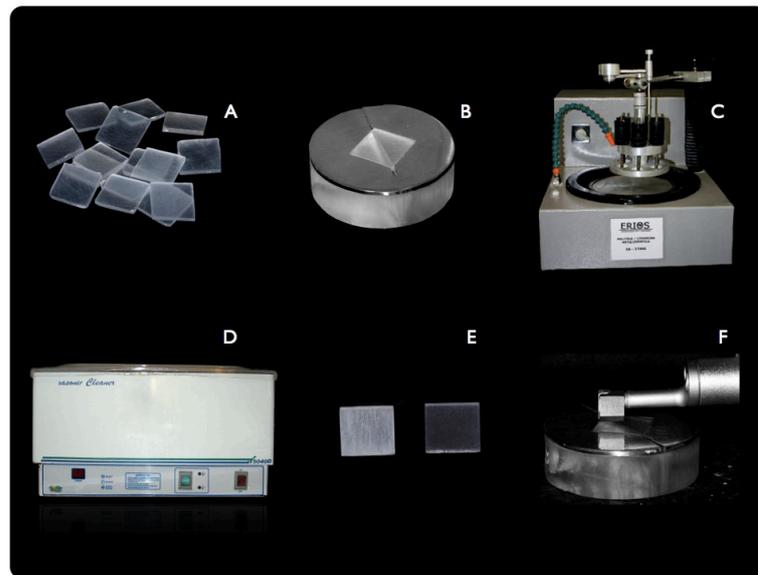


Figura 5: Espécimes após acabamento e aferição com paquímetro (A). Espécimes fixados a dispositivo adaptado de resina acrílica em forma de disco (B). Politriz para dispositivos múltiplos onde foi realizada a padronização da rugosidade superficial (C). Ultrassom para limpeza dos grânulos, entre lixas e/ou ao final da padronização da rugosidade (D). Espécimes polidos com lixa de grânulo 120 e com lixas 600 e 1200, respectivamente (E). Aferição da rugosidade superficial dos espécimes com rugosímetro (F).

3.1.6 Polimento Líquido

Das 210 amostras com rugosidade média de 3 μm , 140 foram selecionadas aleatoriamente para ser aplicado o polimento líquido. Metade destas (70) recebeu, em suas superfícies, uma camada de Biscover LV (Bisco, Schaumburg, USA) e, a outra metade (70), uma camada de Surface Coat (Kuraray, Tokyo, Japan).

O polimento líquido foi aplicado de acordo com as instruções dos fabricantes: sobre a superfície limpa e seca, com um pincel pelo de marta Condor nº415 (Condor S.A., São Bento do Sul, Brasil), cada face da amostra recebeu uma fina camada do material e foi fotopolimerizada durante 30 s para Biscover LV e 20 s para Surface Coat, com um fotopolimerizador de luz fria Ultraled (Dabi Atlante, São Paulo, Brasil), previamente aferido com um radiômetro (DMC, São Paulo, Brasil), no qual apresentou comprimento de onda de 550 mW/cm^2 .

Após polimerizadas, as superfícies foram aferidas com o rugosímetro SurfTest SJ-301 (Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan), conforme descrito anteriormente, a fim de verificar a rugosidade média da superfície coberta com polimento líquido, que apresentou valores de aproximadamente 0,3 μm (Figura 6).

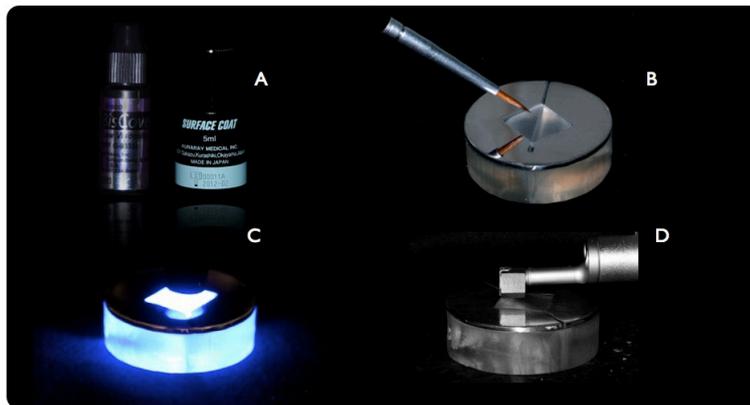


Figura 6: Sistema de polimento líquido utilizados: Biscover LV e Surface Coat (A). Aplicação de polimento líquido nas amostras com rugosidade superficial de 3 μm segundo as instruções dos fabricantes (B). Fotopolimerização da camada de polimento líquido conforme as instruções dos fabricantes (C). Aferição da rugosidade superficial após aplicação da camada de polimento líquido (D).

3.2 Distribuição dos grupos

As amostras foram agrupadas aleatoriamente de acordo com o tratamento de superfície recebido, tipo de solução química utilizada e número de ciclos submetidos (Tabela 1). Foram totalizados 20 grupos (n=14), onde em cada grupo, 12 amostras foram destinadas para análise quantitativa (coloração com Cristal Violeta) e 2 amostras para análise qualitativa (Microscopia Eletrônica de Varredura).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com tratamento de superfície, desinfetante químico e número de ciclos utilizados.

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE	SOLUÇÃO QUÍMICA	CICLOS
Polimento mecânico (Rugosidade média de 3 μm) 70 amostras 5 grupos (n=14)	Nenhum (Controle negativo)	0
	Água destilada (Controle positivo)	30
		90
	Hipoclorito de Sódio 1% (10 min)	30
90		
Polimento mecânico (3 μm) e Polimento líquido (0,3 μm) Biscover LV 70 amostras 5 grupos (n=14)	Nenhum (Controle negativo)	0
	Água destilada (Controle positivo)	30
		90
	Hipoclorito de Sódio 1% (10 min)	30
90		
Polimento mecânico (3 μm) e Polimento líquido (0,3 μm) Surface Coat 70 amostras 5 grupos (n=14)	Nenhum (Controle negativo)	0
	Água destilada (Controle positivo)	30
		90
	Hipoclorito de Sódio 1% (10 min)	30
90		
Polimento mecânico (Rugosidade média de 0,3 μm) 70 amostras 5 grupos (n=14)	Nenhum (Controle negativo)	0
	Água destilada (Controle positivo)	30
		90
	Hipoclorito de Sódio 1% (10 min)	30
90		

3.3 Desinfecção com hipoclorito de sódio 1%

O protocolo de desinfecção química adotado foi baseado em trabalhos que comprovadamente evidenciaram a desinfecção de *C. albicans* em resinas acrílicas para bases de dentaduras, o qual preconiza a exposição em solução de hipoclorito de sódio 1% durante 10 min (PAVARINA *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2010). Dessa forma, para simular o processo de desinfecção, foi assumido que cada 10 min de exposição a solução química era equivalente a 1 ciclo. Os corpos de prova de cada grupo experimental foram individualmente colocados em recipientes contendo 2 mL da solução de hipoclorito de sódio 1% (Farmácia Specifica, Bauru, Brasil) e deixados imersos durante o tempo correspondente ao número de ciclos estabelecidos para cada um dos grupos descritos neste estudo. Os grupos correspondentes a 90 ciclos, permaneceram 900 min imersos, enquanto que os grupos de 30 ciclos, 300 min. Decorrido o tempo de imersão no desinfetante, as amostras foram retiradas e individualmente imersas em um novo recipiente contendo 2 mL de água destilada para lavagem, onde permaneceram durante 30 min para 30 ciclos e 90 min para 90 ciclos. O procedimento de lavagem foi repetido 3 vezes, sempre realizando a troca da água. Os mesmos procedimentos foram realizados com os respectivos controles positivos de cada grupo, porém utilizando água destilada ao invés da solução de hipoclorito de sódio 1%. Os grupos referentes ao controle negativo não sofreram imersão em nenhum tipo de solução. Finalizado o processo de desinfecção, os espécimes foram secos e embalados individualmente para esterilização por meio de óxido de etileno (Acecil – Central de esterilização comércio e indústria, Campinas, Brasil) (MIMA *et al.*, 2008) (Figura 7).



Figura 7: Poços contendo 2 mL de hipoclorito de sódio 1% onde os espécimes permaneceram individualmente imersos durante o tempo correspondente ao número de ciclos desejado: 300 min para 30 ciclos ou 900 min para 90 ciclos (A). Poços contendo 2 mL de água destilada, destinados a lavagem tripla dos espécimes após desinfecção, que permaneceram por 30 min (30 ciclos) ou 90 min (90 ciclos) em cada poço de lavagem (B). Solução de hipoclorito de sódio 1% (Farmácia Específica, Bauru, SP) (C).

3.4 Imersão em saliva artificial

Após esterilizados, os corpos de prova foram imersos em saliva artificial, simulando a influência da formação da película adquirida na colonização de *C. albicans*. O meio de saliva foi preparado de acordo com a composição e concentrações descritas por Hahnel *et. al*, (HAHNEL *et. al*, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 – Componentes da saliva artificial e suas respectivas concentrações.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Solução Tampão Fosfato (PBS)*	Base
Albumina bovina*	40 µg/mL
α-amilase de pâncreas de porco**	1 mg/mL
Lisozima retirado de ovo de galinha**	10 µg/mL
Mucina de estômago de porco*	850 mg/L

*Sigma-Aldrich, St Louis, USA. **Fluka Bio-chemika, Buchs, Switzerland.

Os componentes e concentrações dos componentes utilizados nesta fórmula são similares aos encontrados na saliva total humana e foi utilizada em diversos estudos para colonização de microrganismos, incluindo *C. albicans* (HAHNEL *et. al*, 2008; HAHNEL *et. al*, 2010; BUERGERS *et. al*, 2010). Para a formação da película adquirida, foi dispensado 2 mL da saliva artificial, em poços de uma placa de 24

poços, onde os corpos de prova foram imersos e permaneceram por 2 h à 37° C (HAHNEL *et. al*, 2008; HAHNEL *et. al*, 2010; BUERGERS *et. al*, 2010) (Figura 8). Após este período, os corpos de prova em acrílico foram secos à temperatura ambiente por 30 min, quando então foram inoculados com o patógeno.

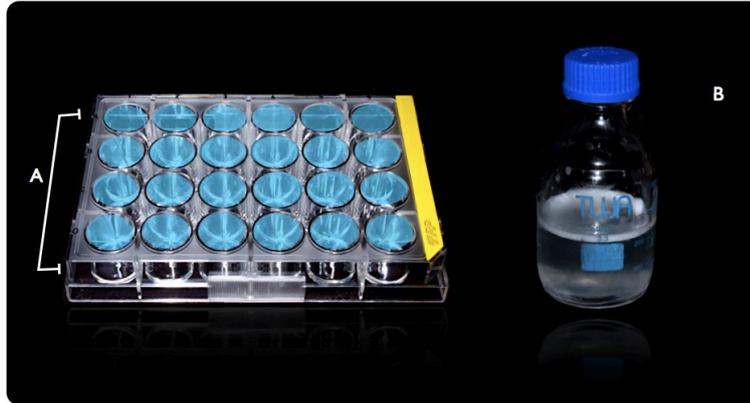


Figura 8: Poços contendo 2 mL de saliva artificial onde os espécimes permaneceram individualmente imersos durante 2 h para formação da película adquirida salivar (A). Solução de Saliva artificial conforme proposta por Hahnels et al (B).

3.5 Inoculação dos espécimes

Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados no laboratório de Biologia Celular do Centro Integrado de Pesquisa-1 (CIP-1) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, sempre em condições assépticas, em capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70°.

A espécie *C. albicans* (SC 5314) foi reativada de sua cultura original contendo Caldo de Soja Trípico (TSB) (Accumedia Manufacturers, Lansing, USA) a -80° C, em 10 mL de meio de cultura TSB caldo (CAMPANHA *et al.*, 2007) com Cloranfenicol (Carlo Erba, Milan, Italy) e incubada durante 24 h a 37° C em estufa Orion (Fanem, Guarulhos, Brasil), em condições aeróbicas. Após 24 h, a suspensão foi centrifugada na centrífuga 5804R (Eppendorf, Hamburg, Germany), por 10 min, com velocidade de 5.000 rpm, a 22° C, para separação dos microrganismos do sobrenadante. Os fungos isolados foram lavados 2 vezes em solução tampão fosfato (PBS) (Merck, Darmstadt, Germany), para remoção de impurezas e o pelet final foi ressuspenso em PBS.

A seguir, a suspensão foi agitada por 15 s e a turbidez ajustada espectrofotometricamente (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA), a 600 nm, até atingir absorvância similar ao padrão 0,5 da Escala McFarland. Este procedimento promoveu a preparação de uma suspensão celular com uma concentração final de 1×10^7 cels/mL em TSB com cloranfenicol (concentração ótima para formação de biofilme) (CHANDRA; MUKHERJEE; LEIDICH, 2001)

3.6 Formação do biofilme

Utilizando uma pinça estéril (S.S. White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, Brasil), cada amostra foi colocada em um poço de uma placa de cultura celular de 24 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland), no qual foi dispensado 2 mL da suspensão celular, através de pipetas e ponteira descartáveis, deixando os espécimes totalmente submersos. Inicialmente, todas as amostras foram deixadas em cultura com *C. albicans* por 90 min em estufa (Fanem, Guarulhos, Brasil) a 37° C sob agitação. Durante todo o período em que os espécimes foram mantidos em meio de cultura, as placas que os continham foram mantidas sob movimentação constante, com o objetivo de evitar o acúmulo das células fúngicas em uma única área por deposição (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007) (Figura 9).



Figura 9: Poços contendo 2 mL de inóculo de *C. albicans* ASC 5314 a 10^7 cels/mL em TSB (A). Estufa a 37° C com agitação, onde as amostras permaneceram 1h e 30 min para fase de adesão (B). Poços contendo 2 mL de PBS, destinados à lavagem tripla (suave) após adesão, para remoção de células não aderidas (C).

Cessado os 90 min, os espécimes foram suavemente lavados individualmente três vezes em 2 mL de PBS (HAWSER; DOUGLAS, 1994) para garantir a remoção de células não aderidas aos espécimes (KUHN *et al.*, 2002). A seguir, os espécimes foram reinsertidos em 2 mL de TSB e incubados em estufa a 37° C sob agitação por 24 h (KUMAMOTO, 2008; PEREIRA-CENCI *et al.*, 2008) para o desenvolvimento do biofilme (Figura 10).

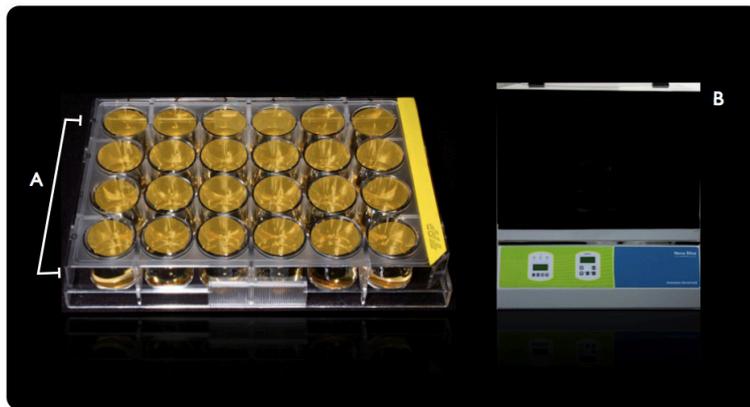


Figura 10: Poços contendo 2 mL de TSB onde as amostras foram inseridas após fase de adesão (A). Estufa a 37° C com agitação, onde as amostras permaneceram por 24 h para desenvolvimento de biofilme (B).

As amostras foram analisadas por métodos quantitativos e qualitativos. Para quantificação do biofilme, foi utilizado o método de coloração por Cristal Violeta através da mensuração do nível de absorbância do sobrenadante obtido após a descoloração do biofilme formado. Para análise qualitativa da integridade da camada de polimento líquido, as superfícies foram fotografadas através do Microscópio Eletrônico de Varredura.

3.7 Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta

Após a formação do biofilme intermediário (24 h), as amostras destinadas a análise quantitativa foram gentilmente lavadas por 3 vezes em 2 mL de PBS e secas em temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida, o biofilme foi fixado utilizando 2 mL de metanol 99% durante 15 min, permanecendo em refrigerador a 15° C durante esse período. O excesso de metanol foi removido com uma micropipeta e então as

amostras foram expostas a temperatura ambiente para total evaporação do fixador. Para a coloração do biofilme, as amostras foram transferidas para um novo poço contendo 2 mL de solução aquosa de Cristal Violeta 0,02%, valor ótimo de concentração deste corante para *C. albicans* (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008).

Foram aguardados 20 min para que ocorresse a completa difusão do corante ao biofilme (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Passados 20 min, as amostras foram suavemente lavadas por 3 vezes em 2 mL de água Milli-Q estéril para remoção do corante não difundido. Posteriormente, as amostras foram transferidas para um novo poço onde foi adicionado 2 mL metanol 95% para descoloração do biofilme e liberação do sobrenadante (JIN et al., 2004; DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDBOROUGH, 2002). O sobrenadante do processo de descoloração foi coletado e, 100 µl da solução, transferida para uma placa de 96 poços, em triplicata (Figura 11). Então, a absorbância da solução foi quantificada pelo espectrofotômetro Fluorstar Optima (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) utilizando o comprimento de onda de 595 nm (YUSUKE et al., 2003; JIN et al., 2004). Para que somente o valor do Cristal Violeta liberado do processo de descoloração fosse quantificado, foi aferido também o valor da absorbância de 100 µl de metanol 95% e utilizado como valor de referência (branco). Sendo assim, foram obtidos resultados da subtração do valor do branco ao sobrenadante (Figura 12).



Figura 11: Poços contendo 2 mL de metanol 99%, onde o biofilme foi fixado, permanecendo em refrigerador por 15 min à 15° C (A). Poços contendo 2 mL de solução aquosa de Cristal Violeta 0,02% para coloração por 20 min (B). Poços contendo 2 mL de água MilliQ, para lavagem tripla (em poços individuais) para remoção da solução de Cristal Violeta não difundida no biofilme (C). Poços contendo 2 mL de metanol 95% onde foi realizado o processo de descoloração, resultando no sobrenadante com concentração de corante correspondente à sua quantidade difundida no biofilme (D). Poços contendo 100 µl de metanol 95% (branco) (E). Poços contendo 100 µl de sobredante, em triplicata, proveniente da descoloração do biofilme (F).

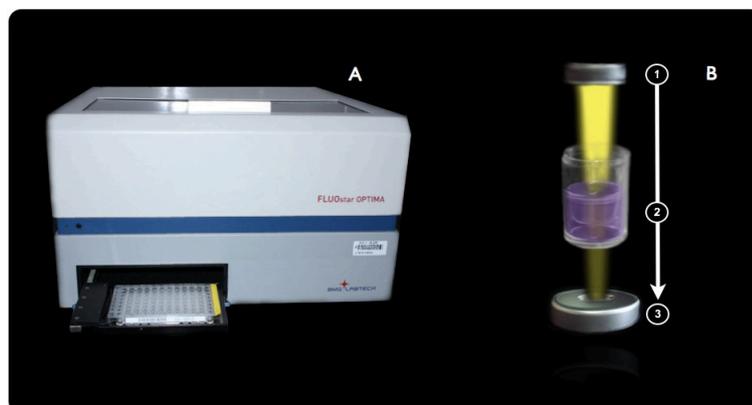


Figura 12: Aparelho de espectrofotômetro FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) no qual foi realizada a leitura das amostras (A). Esquema simplificado de absorvância: (1) Um feixe de luz com comprimento de onda de 595 nm é disparado (2), atravessando o poço da placa com 100 μ l do sobrenadante de concentração desconhecida de Cristal Violeta (3), parte da luz é absorvida e a concentração da substância pode ser calculada a partir da leitura da quantidade de luz transmitida. (B)

3.8 Análise qualitativa com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Concomitantemente a análise quantitativa com Cristal Violeta, a microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização da condição da camada de polimento líquido e a observação do comportamento das células fúngicas do biofilme frente às superfícies testadas. Para esta análise, duas amostras de cada grupo foram destinadas a esse fim. Destas, uma foi metalizada com ouro e teve sua superfície analisada e, a outra, inoculada e o biofilme cultivado conforme descrito anteriormente (Itens 3.4, 3.5 e 3.6), processada para MEV e então analisada.

3.8.1 Processamento das amostras para MEV

Para analisar o biofilme, os corpos de prova foram lavados por 3 vezes em PBS e um exemplar de cada grupo foi encaminhado para fixação em vapor de tetróxido de ósmio. Em capela de exaustão de gases, cada amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro dentro de uma placa de Petri forrada com papel de filtro umedecido (câmara úmida). A seguir, foi coletado 1 mL de tetróxido de ósmio 2% e colocado em uma tampa de refrigerante que, por sua vez, também foi colocada dentro da placa de Petri. Imediatamente, a placa de Petri foi tampada e envolvida com papel alumínio, permanecendo dentro da capela por 48 h. Ao volatilizar, o

tetróxido de ósmio promoveu a fixação dos microrganismos presentes no biofilme sobre os corpos de prova. Após a fixação, a lâmina de vidro com cada corpo de prova foi transferida para um dessecador com sílica-gel, onde permaneceu por 72 h (KITAJIMA e LEITE, 1997; QUATTLEBAUM, 1980; ALVES *et al.*, 2002) (Figura 13 – A, B).

Para analisar a integridade da camada de polimento líquido, um exemplar não contaminado de cada grupo também teve sua superfície observada, não sendo necessário passar pelo processo de fixação por não conter biofilme.

Por fim, todos os corpos de prova foram montados em “stubs” com auxílio de fita adesiva e, na sequência, foram metalizados com ouro (Hammer VII, Alexandria, Egypt) e analisados em Microscópio Eletrônico de Varredura T 220-A (JEOL, Tokyo, Japan) (Figura 13 – C).

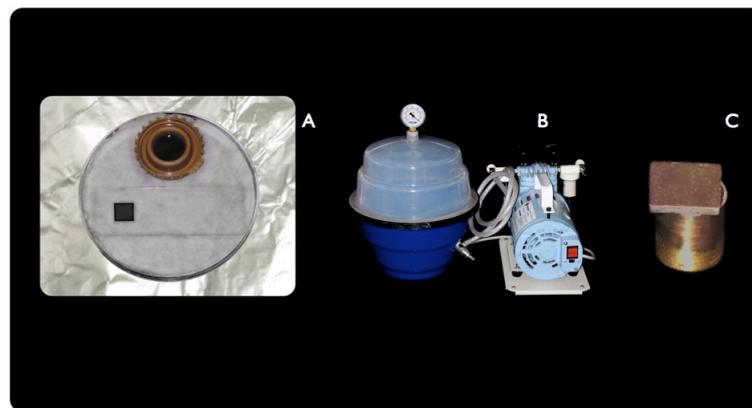


Figura 13: Amostra com aspecto enegrecido após ter seu biofilme fixado com 1 mL de tetróxido de ósmio a 2%, em câmara úmida (A). Câmara de sílica para dessecação dos espécimes pós fixação, onde permaneceram por 72 h (B). Amostra presa ao “stub” e metalizada, pronta para ser examinada (C).

3.8.2 Análise dos corpos de prova através do MEV

A aquisição das imagens foi realizada de maneira padronizada em 6 diferentes campos (SMITH; HUNTER, 2008), de acordo com a Figura 14, a fim de que não houvesse a possibilidade de análise de um mesmo campo repetidas vezes. Para a localização de cada campo, foi utilizado um aumento de 50 vezes. Aumentos maiores de até 1.000 vezes foram utilizados para exploração dos detalhes da superfície da resina acrílica e da morfologia das células fúngicas.

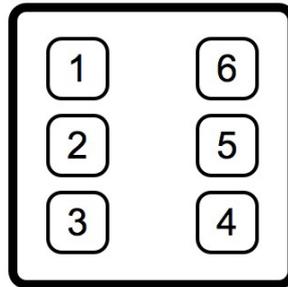


Figura 14: Sequência padrão de análise dos 6 campos dos corpos de prova no MEV.

3.9 Análise estatística

Os valores médios obtidos pela leitura do sobrenadante relativos à formação de biofilme de *C. albicans* nos diversos tipos de tratamento superfície, tempos e soluções químicas avaliadas, foram analisados através do teste paramétrico ANOVA, seguido do teste de Tukey para as comparações múltiplas entre os grupos, com nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Grupos com rugosidade média de 3 µm

4.1.1 Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta

Na análise quantitativa da formação de biofilme de *C. albicans* entre os grupos com rugosidade média de 3 µm, foram observados valores de média e desvio padrão entre $0,420 \pm 0,218$ e $0,756 \pm 0,244$.

Comparando os grupos-controle nos diversos tempos avaliados notou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre si.

Observando os grupos hipoclorito de sódio 1% nos diversos tempos avaliados notou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 30 e 90 ciclos, havendo somente diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo (0 ciclos) e de 90 ciclos.

Nos grupos-controle *versus* hipoclorito de sódio 1%, nos diversos tempos avaliados, observou-se diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos de 90 ciclos (Tabela 3).

Tabela 3 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos na formação de biofilme de *C. albicans* em cada solução, nos diferentes tempos avaliados, na superfície polida mecanicamente com rugosidade média de 3 µm

CICLOS	CONTROLE (ÁGUA)	HIPOCLORITO 1%
0	$0,420 \pm 0,218^{aA}$	$0,420 \pm 0,218^{aA}$
30	$0,471 \pm 0,173^{aA}$	$0,585 \pm 0,257^{abA}$
90	$0,497 \pm 0,204^{aA}$	$0,756 \pm 0,244^{bB}$

Letras minúsculas iguais em cada coluna ou letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre si.

4.1.2 Análise qualitativa da integridade da camada superficial com MEV

As superfícies não contaminadas da resina acrílica termopolimerizável, com rugosidade média de 3 μm dos grupos controle negativo e controle de 30 e 90 ciclos, demonstraram irregularidades e ranhuras profundas ao aumento de 50 vezes. Em um aumento de 1000 vezes as ranhuras superficiais foram evidenciadas com maior clareza onde foi possível notar pequenas escamas, dentro das ranhuras, em todas as amostras dos grupos-controle. Na análise dos corpos de prova colonizados com *C. albicans*, a maior parte dos campos percorridos demonstraram a presença de leveduras e hifas por toda superfície. (Figuras 15, 16 e 17).

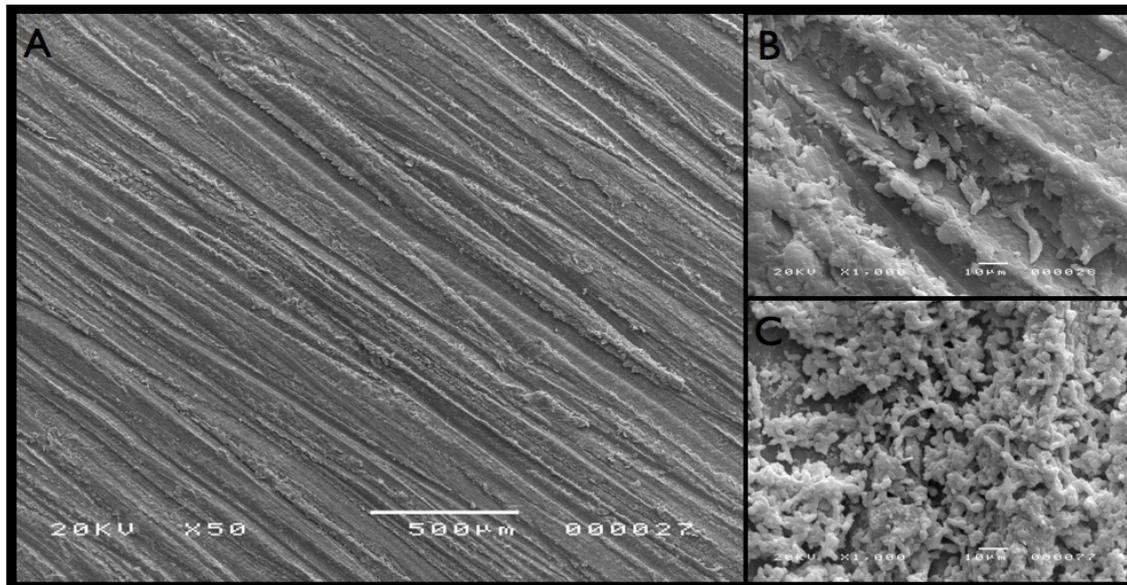


Figura 15: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm do grupo controle negativo. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

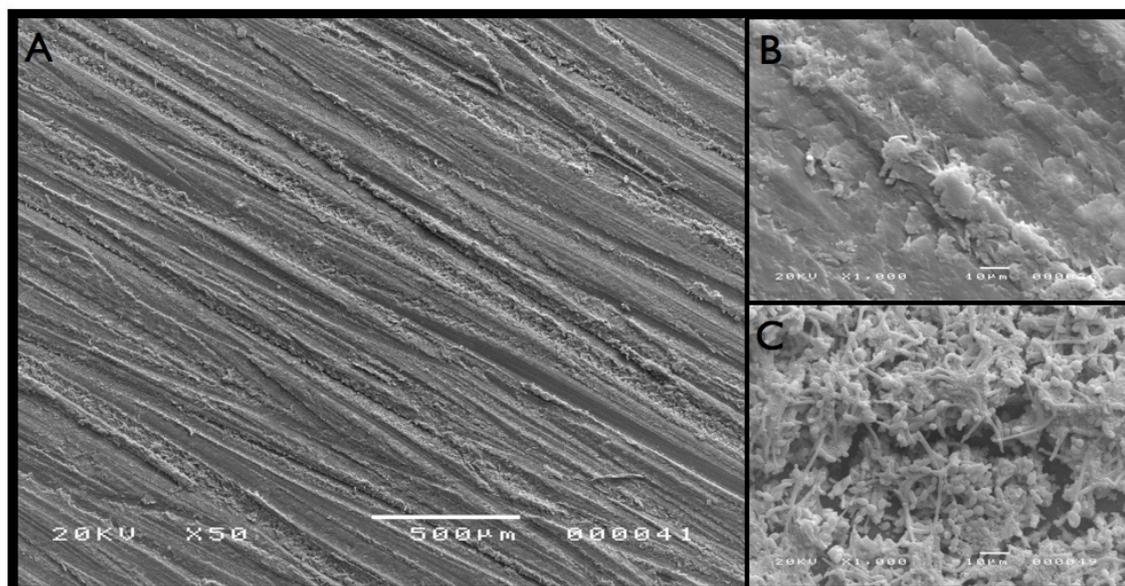


Figura 16: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm do grupo controle de 30 ciclos. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

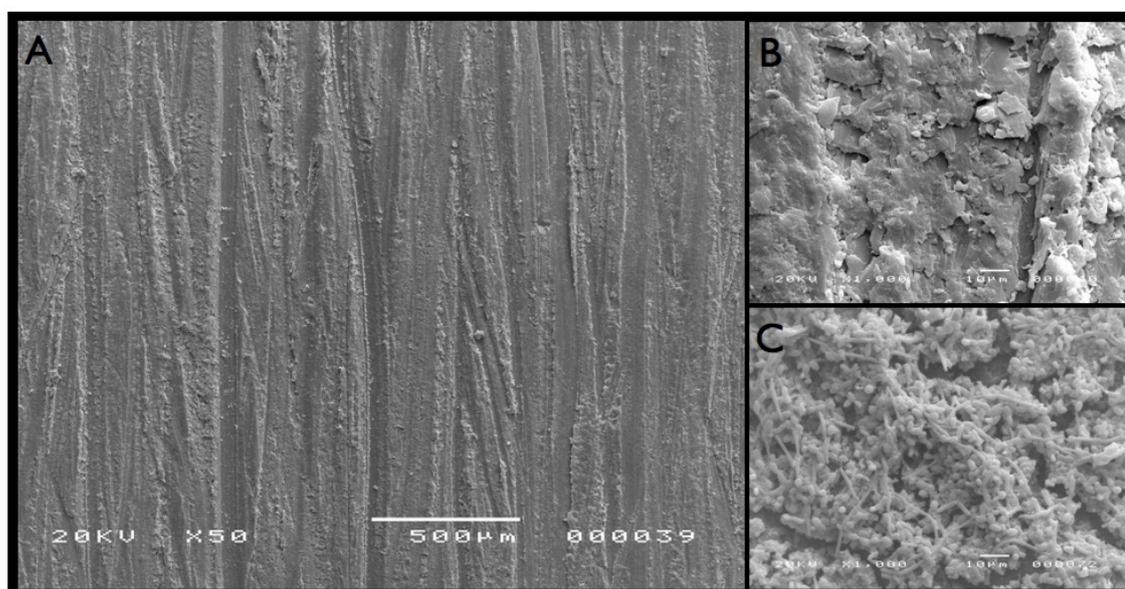


Figura 17: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm do grupo controle de 90 ciclos. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

As superfícies não contaminadas da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm dos grupos hipoclorito de sódio 1% de 30 e 90 ciclos, demonstraram ranhuras profundas e irregularidades ao aumento de 50 vezes. Em um aumento de 1000 vezes não foi notado de forma clara um padrão nas ranhuras, prevalecendo uma superfície altamente desorganizada, possivelmente devido a ação da solução química em ambos os grupos. Na análise dos corpos de prova colonizados com *C. albicans*, a maior parte dos campos percorridos demonstraram a presença de leveduras e hifas por toda superfície. (Figuras 18 e 19).

Comparando os grupos hipoclorito de sódio 1% de 30 e 90 ciclos com os grupos-controle foi possível observar uma nítido aumento da irregularidade na superfície em relação a estes, sendo mais evidente no grupo hipoclorito de sódio 1% de 90 ciclos, quando visto ao aumento de 1000 vezes.

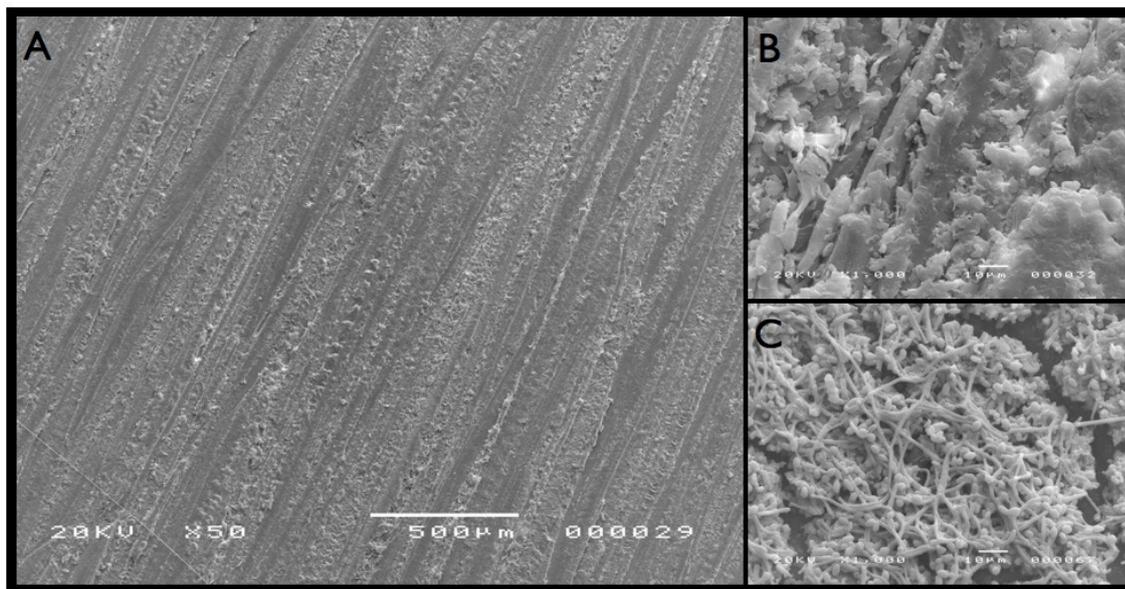


Figura 18: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm do grupo hipoclorito de sódio 1% após 30 ciclos. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

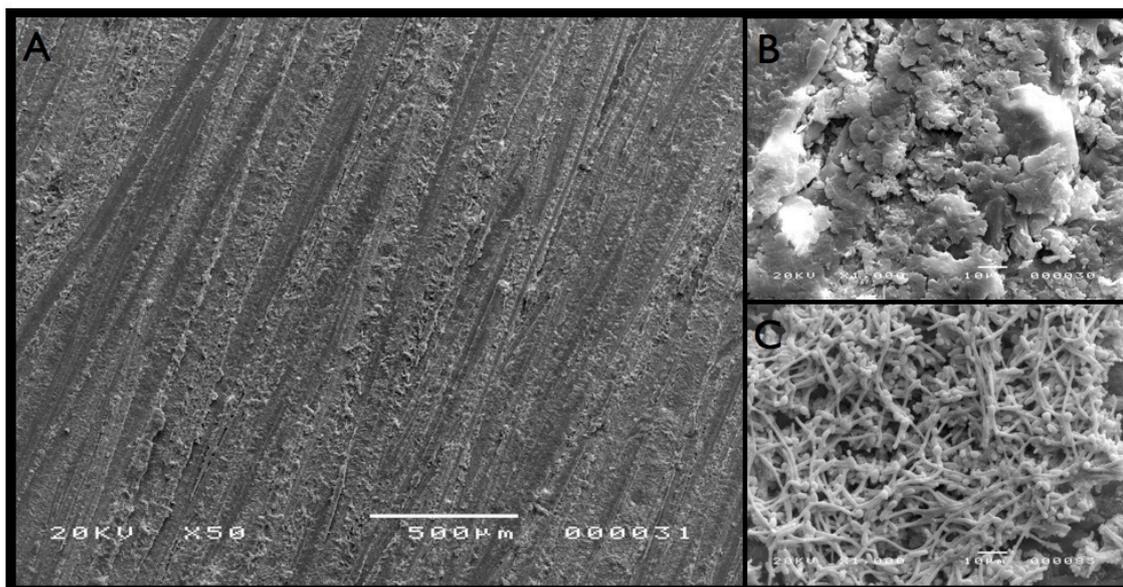


Figura 19: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm do grupo hipoclorito de sódio 1% após 90 ciclos. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

4.2 Grupos com o sistema de polimento líquido Biscover LV

4.2.1 Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta

Na análise quantitativa da formação de biofilme de *C. albicans* entre os grupos com o sistema de polimento líquido Biscover LV, foram observados valores de média e desvio padrão entre $0,091 \pm 0,048$ e $0,186 \pm 0,066$.

Comparando os grupos-controle nos diversos tempos avaliados notou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de 90 ciclos e os demais grupos.

Observando os grupos hipoclorito de sódio 1% nos diversos tempos avaliados notou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de 90 ciclos e o controle negativo.

Nos grupos-controle *versus* hipoclorito de sódio 1% nos diversos tempos avaliados não foi observada diferença estatisticamente significativa entre si (Tabela 4).

Tabela 4 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos na formação de biofilme de *C. albicans* em cada solução, nos diferentes tempos avaliados, na superfície tratada com Biscover LV.

CICLOS	CONTROLE (ÁGUA)	HIPOCLORITO 1%
0	$0,091 \pm 0,048^{aA}$	$0,091 \pm 0,048^{aA}$
30	$0,089 \pm 0,069^{aA}$	$0,145 \pm 0,071^{abA}$
90	$0,174 \pm 0,063^{bA}$	$0,186 \pm 0,066^{bA}$

Letras minúsculas iguais em cada coluna ou letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre si.

4.2.2 Análise qualitativa da integridade da camada superficial com MEV

A análise das superfícies não contaminadas da resina acrílica termopolimerizável coberta com o sistema de polimento líquido Biscover LV, nos grupos controle negativo e controle de 30 e 90 ciclos, demonstrou que as superfícies foram modificadas deixando-as predominantemente regulares, com a presença de alguns pontos e estrias proeminentes na superfície, aparecendo principalmente no grupo de 90 ciclos, quando observadas ao aumento de 50 vezes. Em um aumento de 1000 vezes a camada estava aparentemente íntegra, porém pontos na superfície foram evidenciados novamente, reforçando o que foi visto no aumento de 50 vezes. Na análise dos corpos de prova colonizados com *C. albicans*, a maior parte dos campos percorridos demonstraram a presença de leveduras e hifas por toda superfície. (Figuras 20, 21 e 22).

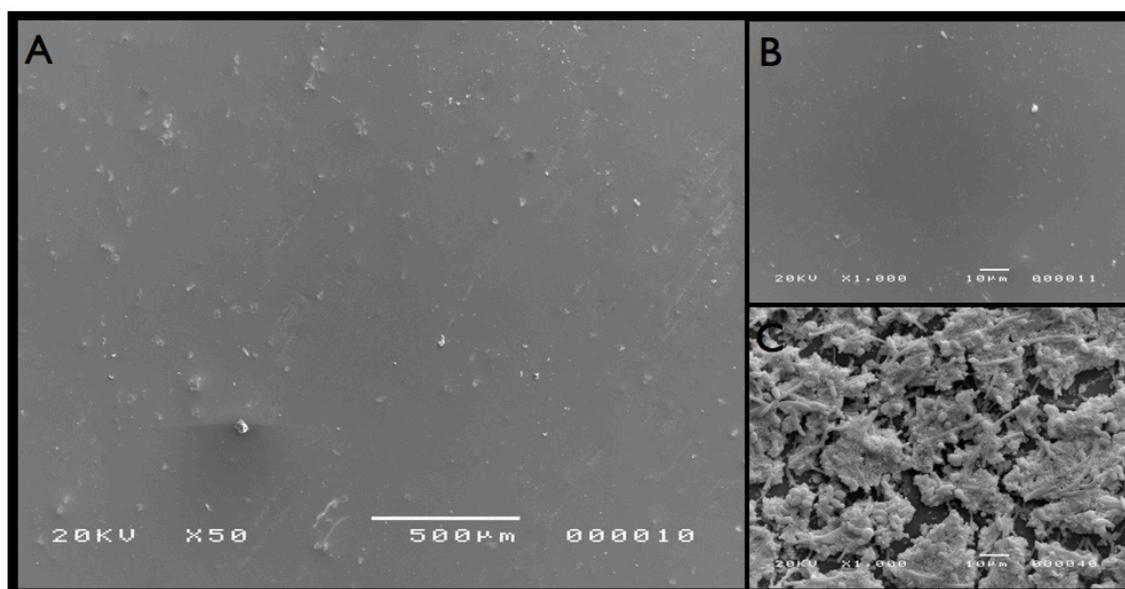


Figura 20: Imagens da superfície do grupo controle negativo da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 µm coberta com o polimento líquido Biscover LV. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

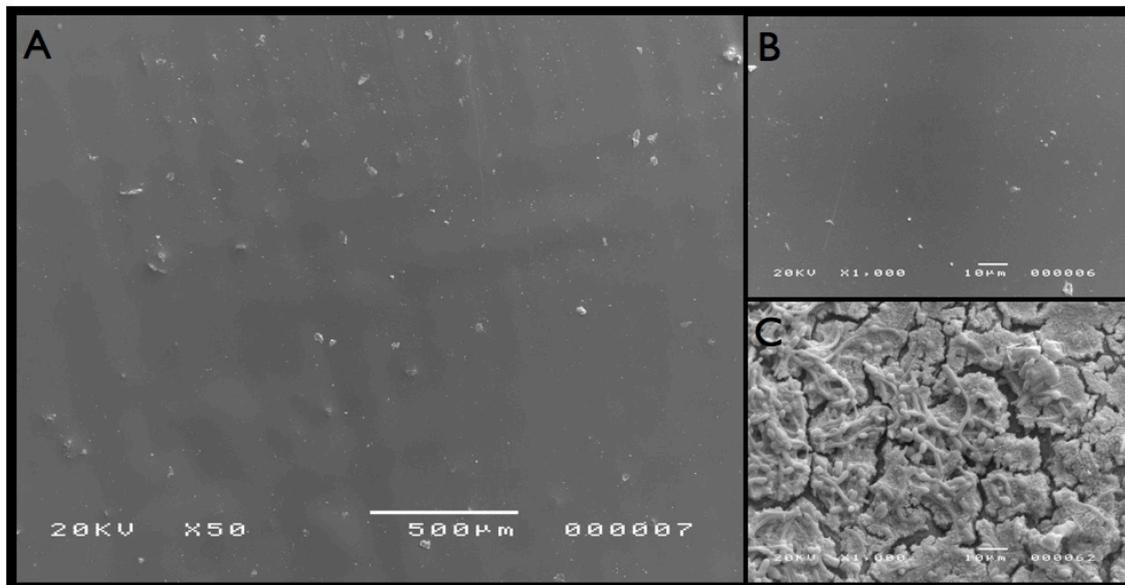


Figura 21: Imagens do grupo controle de 30 ciclos da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm coberta com o polimento líquido Biscover LV. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

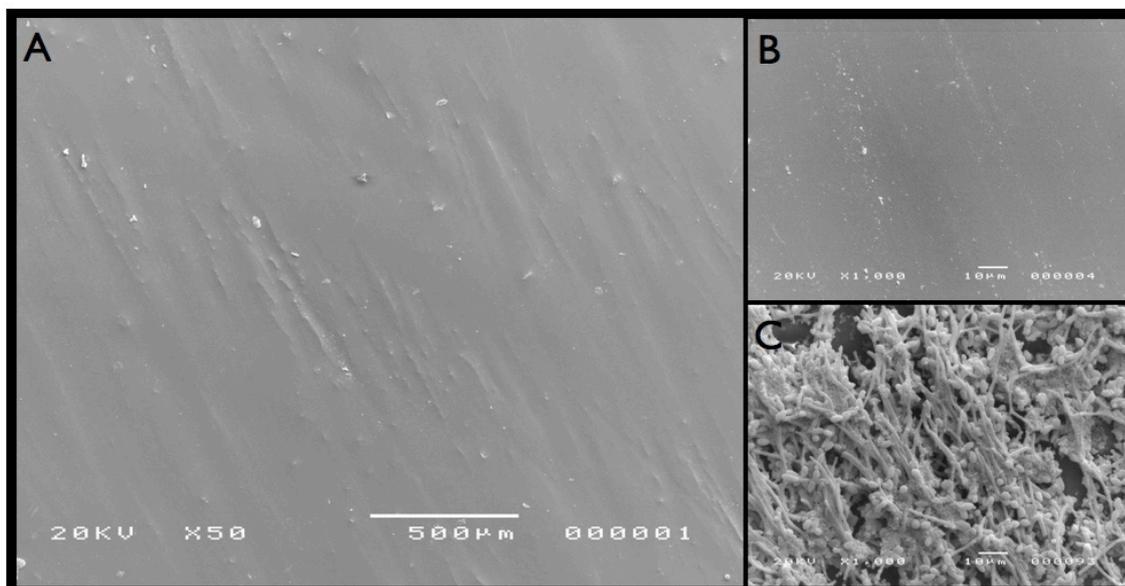


Figura 22: Imagens do grupo controle de 90 ciclos da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm coberta com o polimento líquido Biscover LV. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

A análise das superfícies não contaminadas da resina acrílica termopolimerizável coberta com o sistema de polimento líquido Biscover LV, após desinfecção com hipoclorito de sódio 1% nos grupos de 30 e 90 ciclos, demonstrou uma superfície predominantemente regular com a presença de pontos e ranhuras no grupo de 30 ciclos e, uma superfície levemente irregular com ranhuras acentuadas e uma quantidade de pontos aumentada no grupo de 90 ciclos, quando observadas ao aumento de 50 vezes. Em um aumento de 1000 vezes, a camada estava aparentemente íntegra no grupo de 30 ciclos, porém pontos na superfície foram evidenciados novamente. Neste mesmo aumento, foi possível notar uma degradação da camada superficial do polimento líquido no grupo de 90 ciclos. Na análise dos corpos de prova colonizados com *C. albicans*, a maior parte dos campos percorridos demonstraram a presença de leveduras e hifas por toda superfície. (Figuras 23 e 24).

Comparando o grupo hipoclorito de sódio 1% de 30 ciclos com os grupos-controle, foi possível observar uma semelhança entre o padrão e profundidade das ranhuras com o grupo controle de 90 ciclos. Entretanto, comparando os grupos-controle ao grupo hipoclorito de sódio 1% de 90 ciclos foi notória a degradação da camada deste grupo, principalmente quando vista num aumento de 1000 vezes.

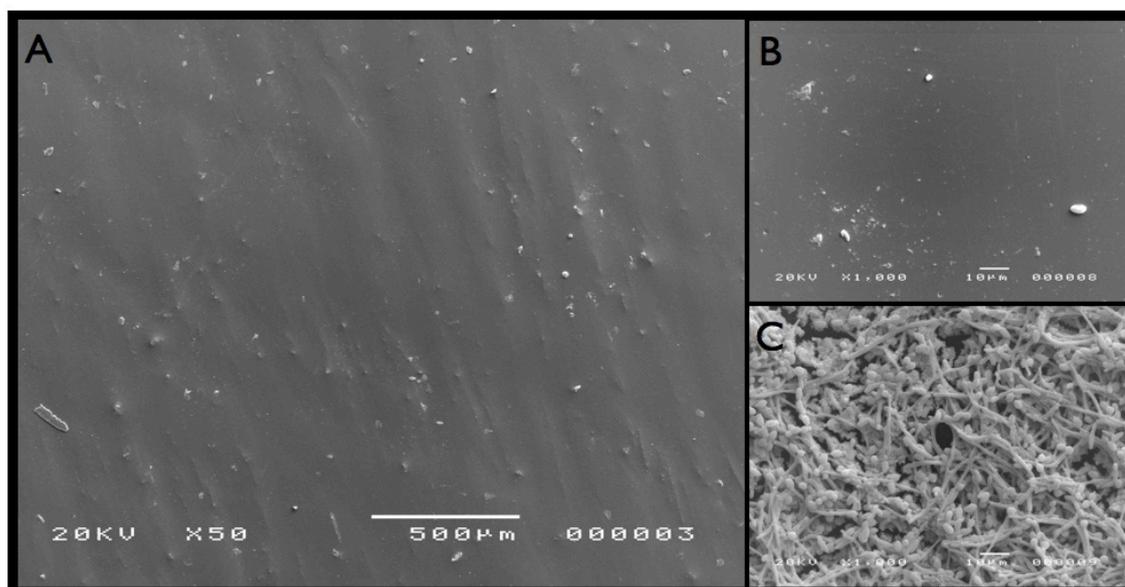


Figura 23: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 µm coberta com o polimento líquido Biscover LV após 30 ciclos de desinfecção com hipoclorito de sódio 1%. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

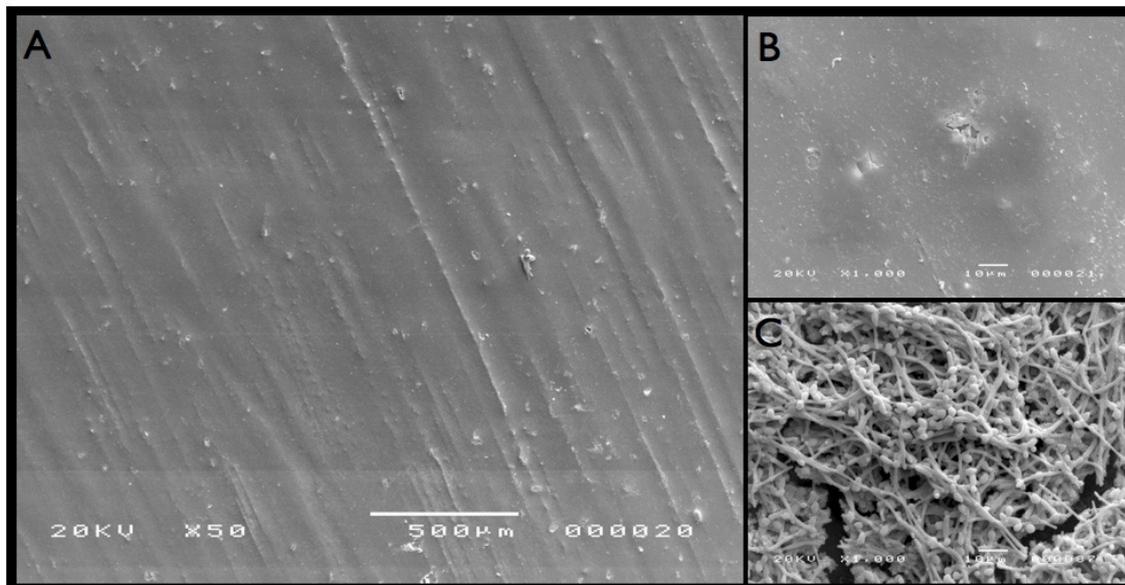


Figura 24: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm coberta com o polimento líquido Biscover LV após 90 ciclos de desinfecção com hipoclorito de sódio 1%. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

4.3 Grupos com o sistema de polimento líquido Surface Coat

4.3.1 Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta

Na análise quantitativa da formação de biofilme de *C. albicans* entre os grupos com o sistema de polimento líquido Surface Coat, foram observados valores de média e desvio padrão entre $0,287 \pm 0,124$ e $0,643 \pm 0,209$.

Comparando os grupos-controle nos diversos tempos avaliados notou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre si.

Observando os grupos hipoclorito de sódio 1% nos diversos tempos avaliados notou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 30 e 90 ciclos, havendo somente diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo (0 ciclos) e os demais grupos.

Nos grupos-controle *versus* hipoclorito de sódio 1% nos diversos tempos avaliados não foi observada diferença estatisticamente significativa entre si (Tabela 5).

Tabela 5 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos na formação de biofilme de *C. albicans* em cada solução, nos diferentes tempos avaliados, na superfície tratada com Surface Coat.

CICLOS	CONTROLE (ÁGUA)	HIPOCLORITO 1%
0	$0,287 \pm 0,124^{aA}$	$0,287 \pm 0,124^{aA}$
30	$0,367 \pm 0,136^{aA}$	$0,514 \pm 0,238^{bA}$
90	$0,437 \pm 0,193^{aA}$	$0,643 \pm 0,209^{bA}$

Letras minúsculas iguais em cada coluna ou letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre si.

4.3.2 Análise qualitativa da integridade da camada superficial com MEV

As superfícies não contaminadas da resina acrílica termopolimerizável coberta com o sistema de polimento líquido Surface Coat, nos grupos controle negativo e controle de 30 e 90 ciclos, foram modificadas, tendo característica predominantemente regular, com a presença alguns pontos proeminentes na superfície, quando observadas ao aumento de 50 vezes. Em um aumento de 1000 vezes, pontos na superfície foram evidenciados novamente, porém a camada estava aparentemente íntegra e todos os grupos apresentaram um mesmo padrão. Na análise dos corpos de prova colonizados com *C. albicans*, a maior parte dos campos percorridos demonstraram a presença de leveduras e hifas por toda superfície. (Figuras 25, 26 e 27).

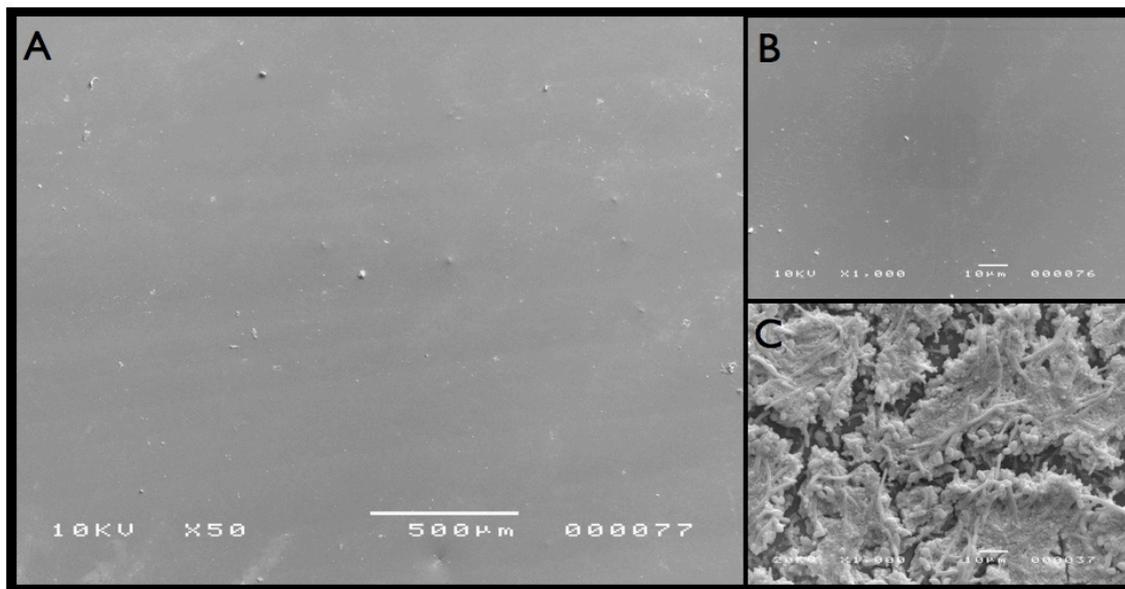


Figura 25: Imagens da superfície do grupo controle negativo da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 µm coberta com o polimento líquido Surface Coat. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

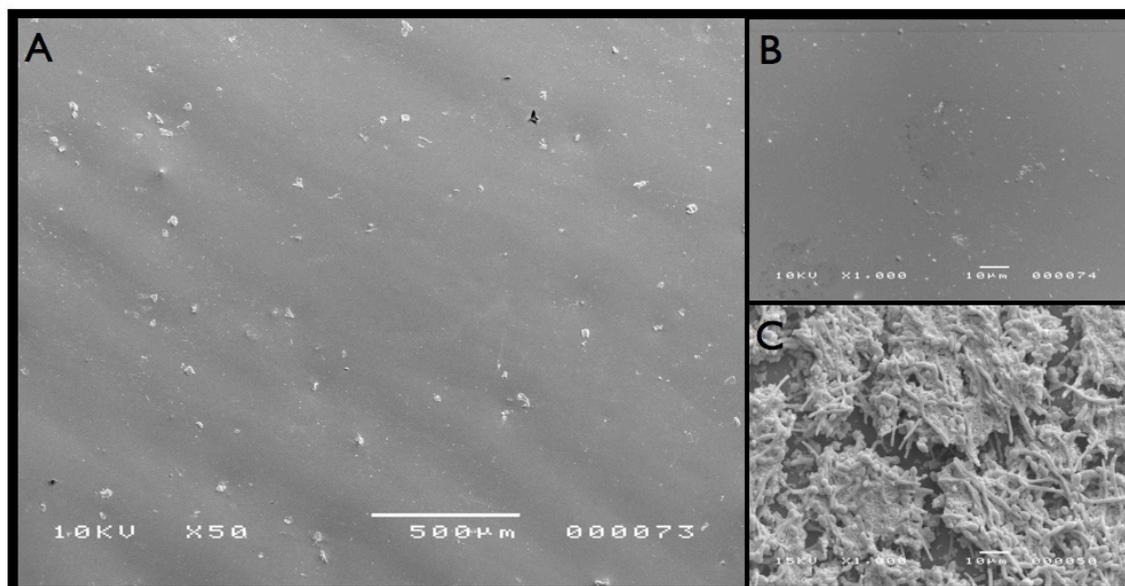


Figura 26: Imagens da superfície do grupo controle de 30 ciclos da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 µm coberta com o polimento líquido Surface Coat. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

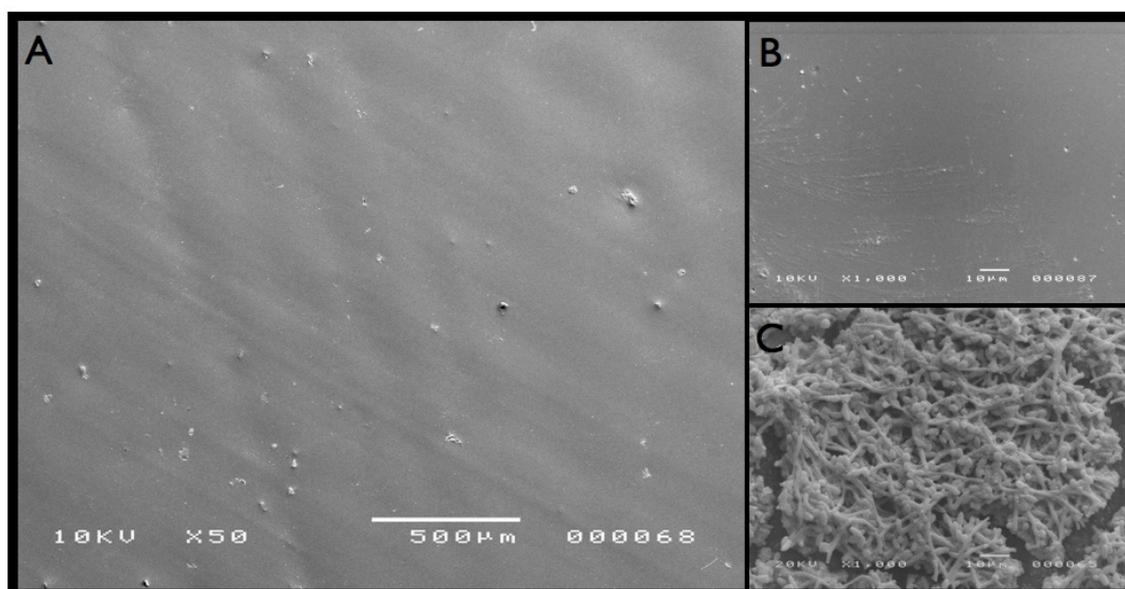


Figura 27: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 µm coberta com o polimento líquido Surface Coat do grupo controle de 90 ciclos. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

As superfícies não contaminadas da resina acrílica termopolimerizável coberta com o sistema de polimento líquido Surface Coat, após desinfecção com hipoclorito de sódio 1% nos grupos de 30 e 90 ciclos, demonstraram irregularidades leves, com marcas e pontos proeminentes, quando observadas ao aumento de 50 vezes. Em um aumento de 1000 vezes, as amostras apresentaram uma camada de polimento líquido degradada, encontrando-se de forma acentuada no grupo de 90 ciclos. Na análise dos corpos de prova colonizados com *C. albicans*, a maior parte dos campos percorridos demonstraram a presença de leveduras e hifas por toda superfície. (Figuras 28 e 29).

Comparando o grupo hipoclorito de sódio 1% de 30 ciclos com os grupos-controle, foi possível observar uma diferença entre o padrão da superfície e quantidade de pontos proeminentes principalmente em relação ao grupo controle negativo. Comparando os grupos-controle ao grupo hipoclorito de sódio 1% de 90 ciclos foi evidente a degradação da camada deste grupo, principalmente quando vista num aumento de 1000 vezes

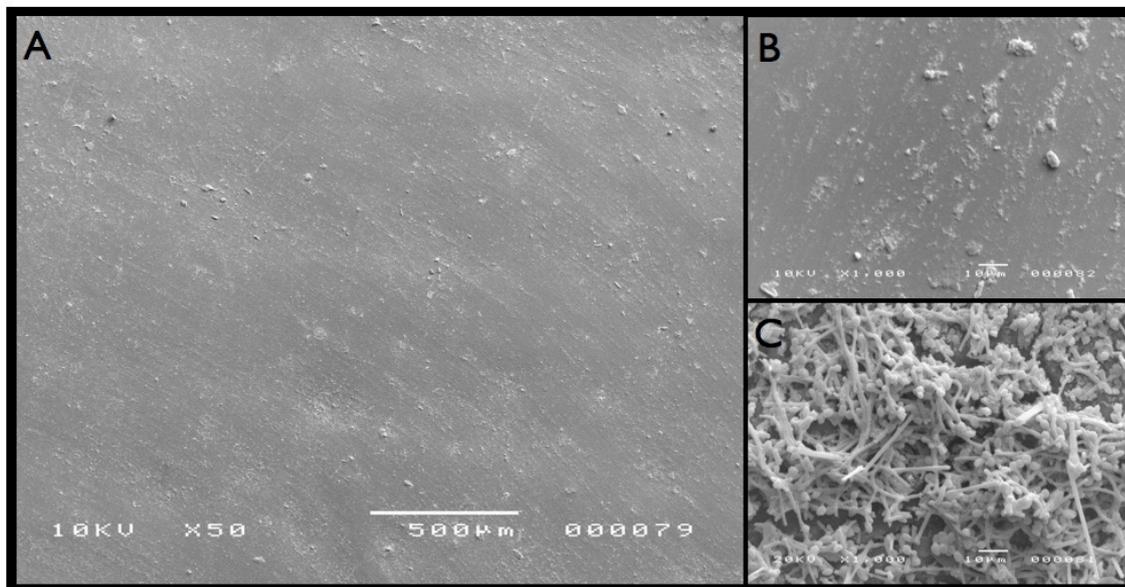


Figura 28: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm coberta com o polimento líquido Surface coat após 30 ciclos de desinfecção com hipoclorito de sódio 1%. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

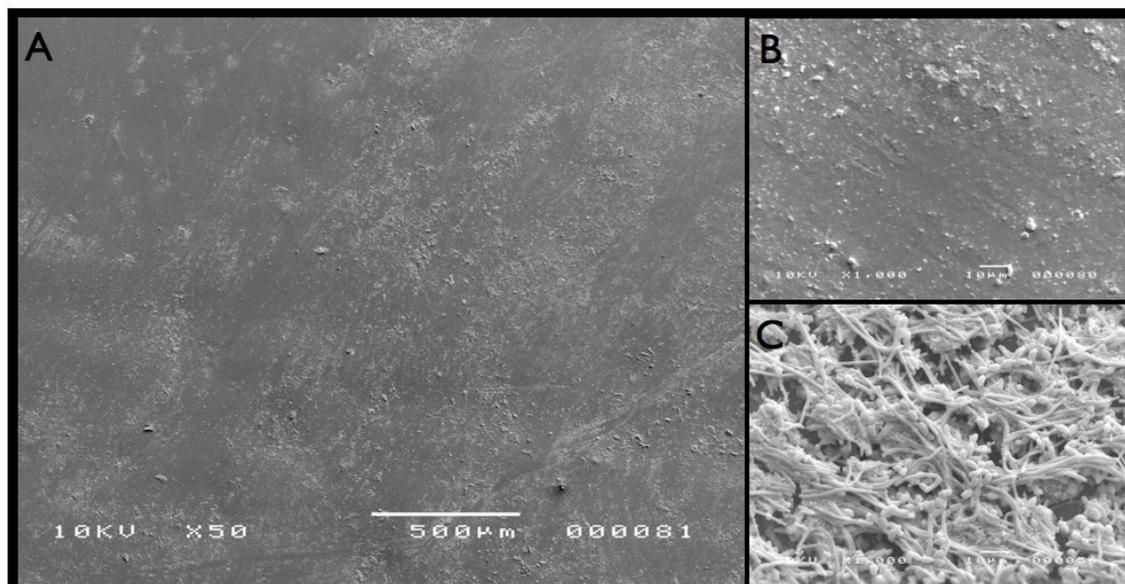


Figura 29: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 3 μm coberta com o polimento líquido Surface Coat após 90 ciclos de desinfecção com hipoclorito de sódio 1%. Foram observados campos da superfície não colonizada com 50 (A) e 1000 x de aumento (B). Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

4.4 Grupos com rugosidade média de 0,3 µm

4.4.1 Análise quantitativa com solução aquosa de Cristal Violeta

Na análise quantitativa da formação de biofilme de *C. albicans* entre os grupos de polimento mecânico com rugosidade média de 0,3 µm, foram observados valores de média e desvio padrão entre $0,013 \pm 0,004$ e $0,120 \pm 0,093$.

Comparando os grupos-controle nos diversos tempos avaliados não foi notada diferença estatisticamente significativa entre si.

Observando os grupos hipoclorito de sódio 1% nos diversos tempos avaliados notou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de 90 ciclos e os demais grupos.

Nos grupos-controle *versus* hipoclorito de sódio 1%, nos diversos tempos avaliados, foi observada diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos de 90 ciclos (Tabela 6).

Tabela 6 - Média e desvio-padrão dos valores de absorbância obtidos na formação de biofilme de *C. albicans* em cada solução, nos diferentes tempos avaliados, na superfície polida mecanicamente com rugosidade média de 0,3 µm.

CICLOS	CONTROLE (ÁGUA)	HIPOCLORITO 1%
0	$0,013 \pm 0,004^{aA}$	$0,013 \pm 0,004^{aA}$
30	$0,025 \pm 0,011^{aA}$	$0,055 \pm 0,045^{aA}$
90	$0,052 \pm 0,029^{aA}$	$0,120 \pm 0,093^{bB}$

Letras minúsculas iguais em cada coluna ou letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre si.

4.4.2 Análise qualitativa da camada superficial com MEV

A análise das superfícies não contaminadas da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de $0,3\ \mu\text{m}$, dos grupos controle negativo e controle de 30 e 90 ciclos, demonstrou superfícies predominantemente regulares e com ranhuras superficiais ao aumento de 50 vezes. Em um aumento de 1000 vezes as ranhuras superficiais foram evidenciadas com maior clareza, onde foi possível notar um aumento gradual e sutil da profundidade das ranhuras, à medida que aumentaram o número de ciclos. Na análise dos corpos de prova colonizados com *C. albicans*, a maior parte dos campos percorridos demonstraram a presença de leveduras e hifas por toda superfície. (Figuras 15, 16 e 17).

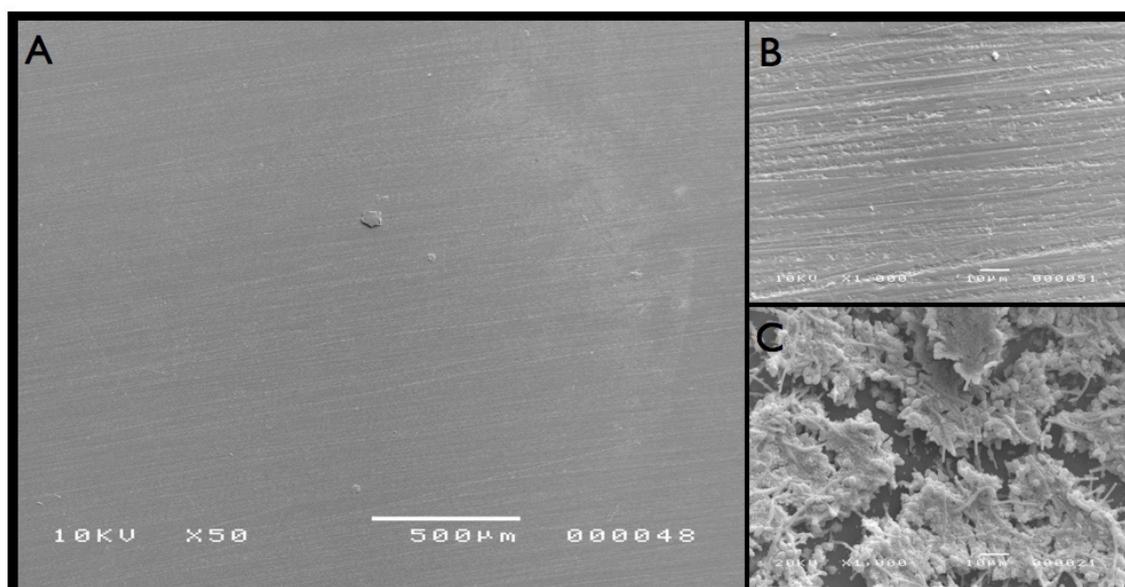


Figura 30: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de $0,3\ \mu\text{m}$ do grupo controle negativo. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

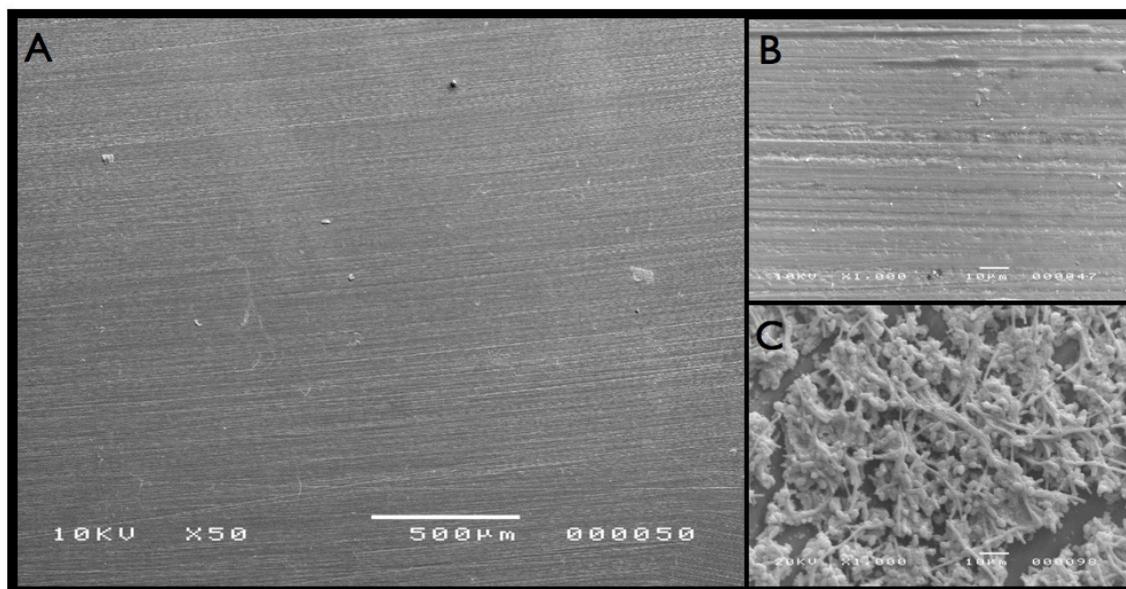


Figura 31: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 0,3 μm do grupo controle de 30 ciclos. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

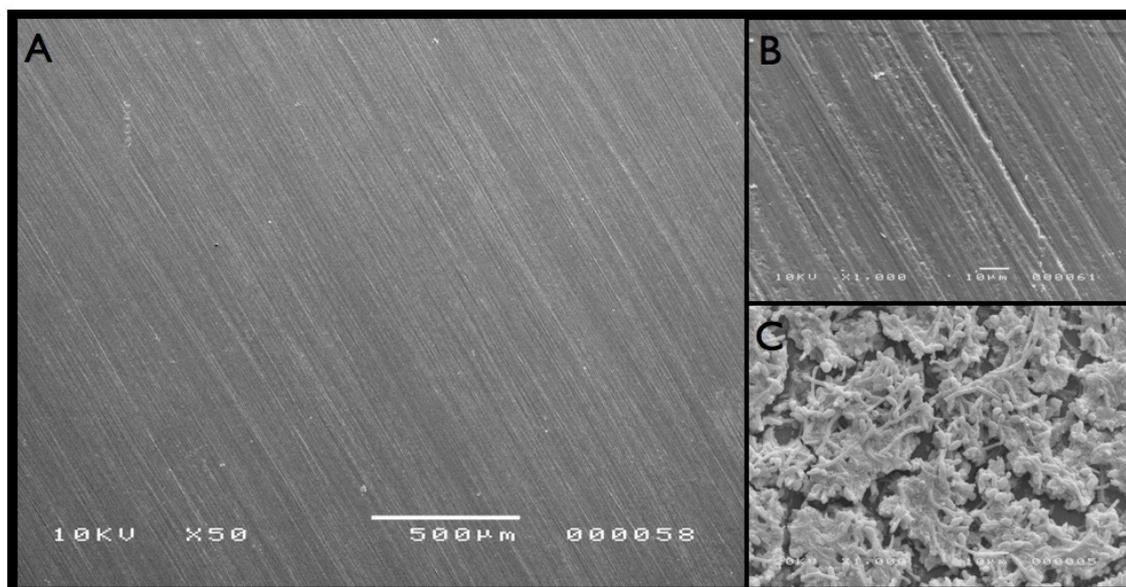


Figura 32: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 0,3 μm do grupo controle de 90 ciclos. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

A análise das superfícies não contaminadas da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de $0,3\ \mu\text{m}$, dos grupos hipoclorito de sódio 1% de 30 e 90 ciclos, demonstrou superfícies predominantemente regulares e com ranhuras superficiais ao aumento de 50 vezes. Em um aumento de 1000 vezes as ranhuras superficiais foram evidenciadas com maior clareza, onde foi possível notar uma degradação da camada superficial no grupo de 90 ciclos em relação ao grupo de 30 ciclos. Na análise dos corpos de prova colonizados com *C. albicans*, a maior parte dos campos percorridos demonstraram a presença de leveduras e hifas por toda superfície. (Figuras 18 e 19).

Comparando o grupo hipoclorito de sódio 1% de 30 ciclos com os grupos-controle, foi possível, de um modo geral, observar uma semelhança entre o padrão e profundidade das ranhuras. Entretanto, quando estes grupos foram comparados ao grupo hipoclorito de sódio 1% de 90 ciclos, foi notória uma maior degradação na superfície deste último, principalmente quando visto ao aumento de 1000 vezes.

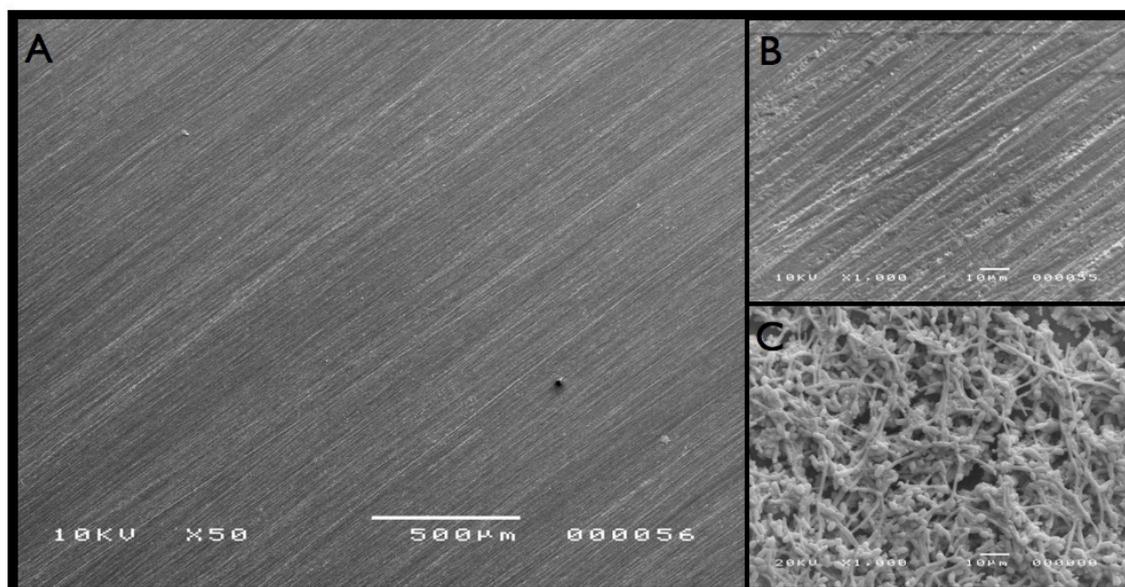


Figura 33: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de $0,3\ \mu\text{m}$ do grupo hipoclorito de sódio 1% após 30 ciclos. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

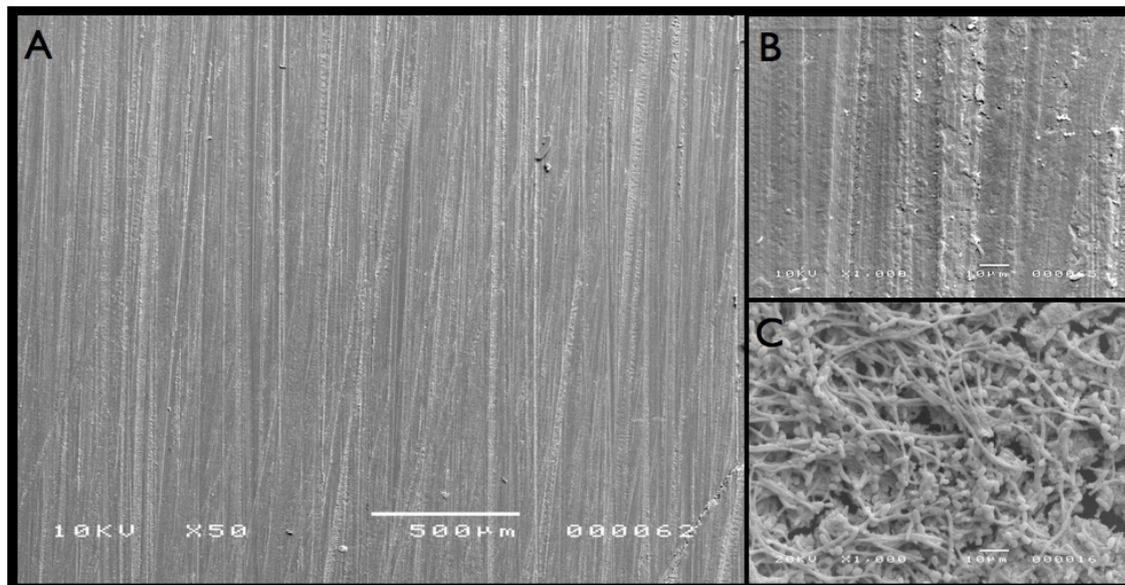


Figura 34: Imagens da superfície da resina acrílica termopolimerizável com rugosidade média de 0,3 µm do grupo hipoclorito de sódio 1% após 90 ciclos. Foram analisados campos com 50 x de aumento (A) e 1000 x de aumento (B) da superfície não contaminada. Também foi observada a superfície colonizada por *C. albicans* com 1000 x de aumento (C).

4.5 Grupos por mesmo número de ciclos e soluções testadas

4.5.1 Análise quantitativa do biofilme com solução aquosa de Cristal Violeta

Na análise quantitativa da formação de biofilme de *C. albicans* entre os grupos com os diversos tipos de tratamentos de superfícies e tempos avaliados, foram observados valores de média e desvio padrão entre $0,120 \pm 0,093$ e $0,756 \pm 0,244$.

Comparando os tipos de tratamentos de superfície avaliados dentro do mesmo tempo e soluções testadas não pode-se notar diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 0,3 μm e Biscover LV ou 3 μm e Surface Coat quando comparados entre si. Porém quando comparados os grupos de 0,3 μm e Biscover LV aos grupos de 3 μm e Surface Coat, estes apresentaram diferença estatisticamente significativa (Tabela 7).

Tabela 7 - Média e desvio-padrão dos valores de absorvância obtidos na formação de biofilme de *C. albicans* em cada grupo, nos diferentes tipos de tratamento de superfície, soluções e tempos avaliados.

	0,3 μm	Biscover LV	Surface Coat	3 μm
0	$0,013 \pm 0,004^{aA}$	$0,091 \pm 0,048^{aA}$	$0,287 \pm 0,124^{aB}$	$0,420 \pm 0,218^{aB}$
C30	$0,025 \pm 0,011^{aA}$	$0,089 \pm 0,069^{aA}$	$0,367 \pm 0,136^{abB}$	$0,471 \pm 0,173^{aB}$
H30	$0,055 \pm 0,045^{aA}$	$0,145 \pm 0,071^{abA}$	$0,514 \pm 0,238^{bB}$	$0,585 \pm 0,257^{abB}$
C90	$0,052 \pm 0,029^{aA}$	$0,174 \pm 0,063^{bA}$	$0,437 \pm 0,193^{abB}$	$0,497 \pm 0,204^{aB}$
H90	$0,120 \pm 0,093^{bA}$	$0,186 \pm 0,066^{bA}$	$0,643 \pm 0,209^{bB}$	$0,756 \pm 0,244^{bB}$

C - Controle; H - Hipoclorito 1%; 0, 30, 90 - Números de ciclos. Letras minúsculas iguais em cada coluna ou letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre si.

4.5.2 Análise qualitativa da integridade da camada superficial com MEV

Num aumento de 1000 vezes, a análise em MEV dos grupos controle negativo e controle de 30 e de 90 ciclos, nos diversos tipos de tratamento de superfície avaliados, revelou uma superfície regular e sem ranhuras para os grupos tratados com polimento líquido, enquanto que ranhuras superficiais foram observadas no grupo com polimento com rugosidade média de $0,3 \mu\text{m}$. No grupo de polimento com rugosidade média de $3 \mu\text{m}$, ranhuras profundas puderam ser observadas, apresentando uma superfície irregular e rugosa (Figuras 35, 36 e 37).

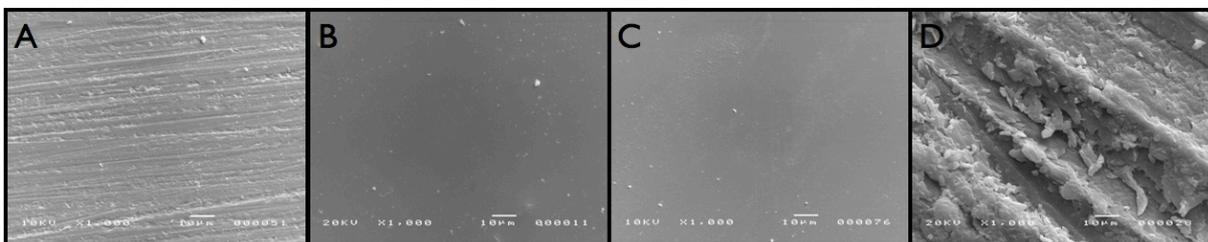


Figura 35: Imagens com 1000 x de aumento dos grupos controle negativo das superfícies com rugosidade média de $0,3 \mu\text{m}$ (A), Biscover LV (B), Surface Coat (C), e rugosidade média de $3 \mu\text{m}$ (D).

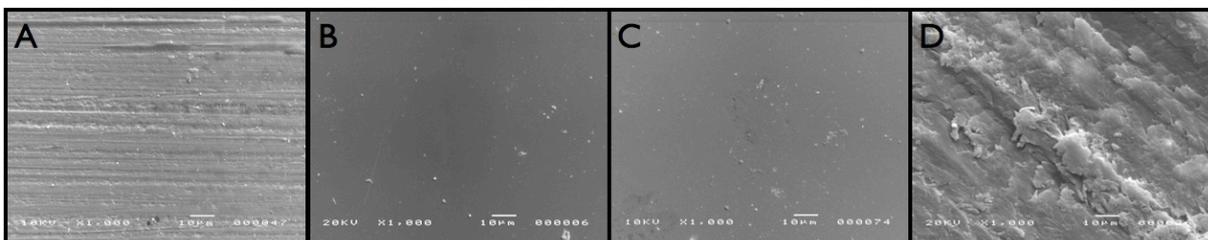


Figura 36: Imagens com 1000 x de aumento dos grupos controle de 30 ciclos das superfícies com rugosidade média de $0,3 \mu\text{m}$ (A), Biscover LV (B), Surface Coat (C), e rugosidade média de $3 \mu\text{m}$ (D).

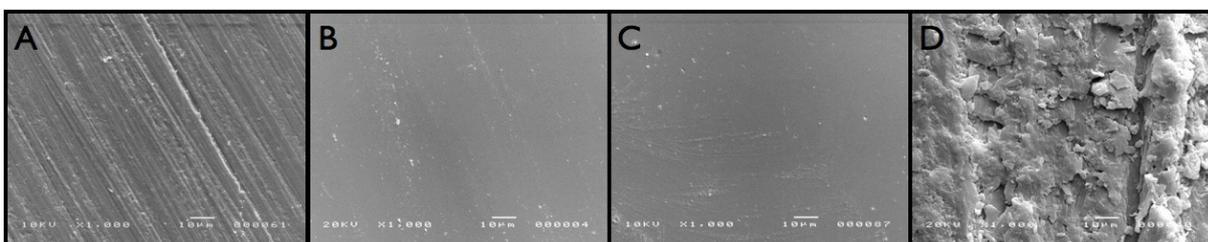


Figura 37: Imagens com 1000 x de aumento dos grupos controle de 90 ciclos das superfícies com rugosidade média de $0,3 \mu\text{m}$ (A), Biscover LV (B), Surface Coat (C), e rugosidade média de $3 \mu\text{m}$ (D).

Num aumento de 1000 vezes, a análise em MEV dos grupos hipoclorito de sódio 1% de 30 ciclos nos diversos tipos de tratamento de superfície avaliados revelou uma superfície regular, com a presença de pontos brancos para os grupos tratados com polimento líquido, enquanto que ranhuras superficiais foram observadas no grupo de polimento com rugosidade média de $0,3\ \mu\text{m}$. A amostra do grupo de polimento com rugosidade média de $3\ \mu\text{m}$ apresentou uma superfície irregular e desorganizada, sendo discrepante a todas as outras (Figura 37).

Nos grupos de 90 ciclos, pudemos observar com mais evidência a ação do hipoclorito de sódio 1% sobre a superfície dos corpos de prova. Foi notado uma degradação das camadas de polimento líquido, principalmente na tratada com Surface Coat. A amostra com rugosidade média de $0,3\ \mu\text{m}$ também apresentou sinais de alteração na estrutura das suas ranhuras. A amostra com rugosidade média de $3\ \mu\text{m}$ apresentou uma superfície altamente irregular e desorganizada, sendo discrepante a todas as outras (Figura 38).

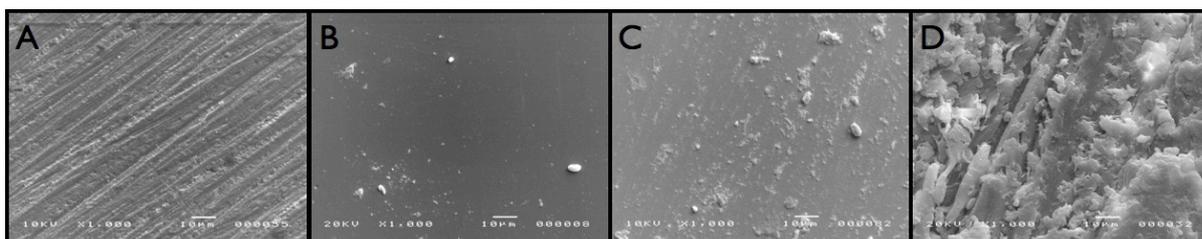


Figura 38: Imagens com 1000 x de aumento das superfícies com rugosidade média de $0,3\ \mu\text{m}$ (A), Biscover LV (B), Surface Coat (C), e rugosidade média de $3\ \mu\text{m}$ (D) após 30 ciclos de desinfecção com hipoclorito de sódio 1%.

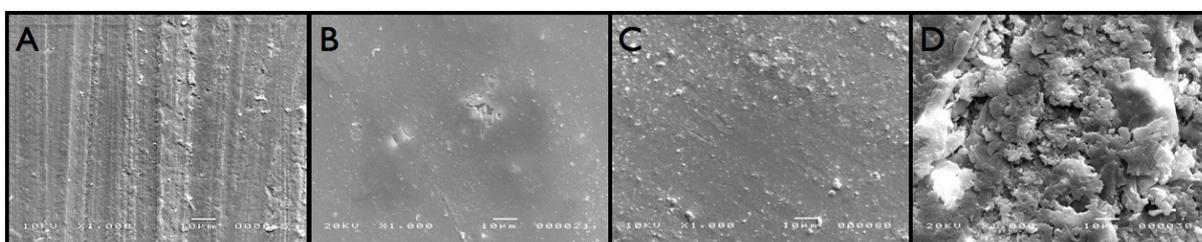


Figura 39: Imagens com 1000 x de aumento das superfícies com rugosidade média de $0,3\ \mu\text{m}$ (A), Biscover LV (B), Surface Coat (C), e rugosidade média de $3\ \mu\text{m}$ (D) após 90 ciclos de desinfecção com hipoclorito de sódio 1%.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Discussão do Materiais e Método

As tentativas de modificar as superfícies de materiais poliméricos, em especial a resina acrílica para confecção de dentaduras, com o intuito de minimizar ou eliminar a formação de biofilme é uma prática antiga. Entretanto, são raros os trabalhos na literatura que visaram modificar a superfície interna de próteses totais, já que a alteração dessa área poderia causar desadaptação da prótese ou desconforto ao paciente.

Alguns trabalhos utilizaram sistemas de polimento líquido para esse fim, obtendo sucesso quanto a adaptação e conforto (BUDTZ-JORGENSEN; KAABER, 1986; SESMA *et al.*, 2005), porém foram vistos sinais de degradação da camada do produto em três meses, acumulando uma quantidade aumentada de biofilme na superfície degradada (SESMA *et al.*, 2005). Observando os avanços nos últimos anos referentes a longevidade e efetividade dos compósitos, apostamos no surgimento de novos sistemas de polimento líquido que ainda não foram utilizados em bases de próteses totais, mas que talvez pudessem ter superado tais problemas até então encontrados. Além disso, de forma inédita propusemos avaliar o comportamento dessas substâncias frente a simulação de um protocolo de desinfecção química, normalmente recomendados como complemento à limpeza mecânica da prótese (ABELSON, 1985; BUDTZ- JORGENSEN, 1979; CHAN *et al.*, 1991; DILLS *et al.*, 1988; LOMBARDI; BUDTZ- JORGENSEN, 1993).

A modificação da superfície proporcionada pela camada de polimento líquido, associada a implementação de um protocolo de desinfecção química seria de grande valia para os usuários de dentaduras, pois além de facilitar a remoção mecânica do biofilme (BUDTZ-JORGENSEN; KAABER, 1986;), eliminaria quimicamente os patógenos remanescentes, contribuindo para a manutenção da saúde de idosos, pacientes especiais que tenham sua capacidade de atenção e atividade motora diminuídas e principalmente imunodeprimidos. (KLEIN *et al.*, 1984; GREENSPAN; GREENSPAN, 1987; SCHMID *et al.*, 1992)

Para o delineamento do trabalho, foram propostos grupos com diferentes valores de rugosidade, já que este, entre outros, é o principal fator modificador de superfície dos sistemas de polimento líquido. O grupo de polimento mecânico com rugosidade média de 0,3 serviu para observarmos o crescimento do biofilme frente a uma rugosidade baixa, uma vez que o limiar de adesão microbiana é de 0,2 μm (QUIRYNEN *et al.*, 1990). Além disso, este grupo atuou como um parâmetro positivo em relação a rugosidade dos grupos tratados com os sistemas de polimento líquido, uma vez que este seria o comportamento ideal que as superfícies tratadas deveriam demonstrar, inclusive após desinfecção com hipoclorito de sódio 1%.

Do mesmo modo, o grupo de polimento mecânico com rugosidade média de 3 μm atuou como parâmetro negativo, uma vez que uma superfície de 3 μm é crítica para a colonização microbiana, similar as superfícies internas da prótese total. Esta superfície serviu para demonstrar o crescimento de biofilme frente a uma rugosidade elevada, sendo assim, poder-se-ia ter um valor do quanto de biofilme seria indesejável que uma superfície tivesse.

Avaliou-se também a capacidade dos sistemas de polimento líquido em modificar a superfície e sua longevidade frente aos desafios propostos neste trabalho, por isso, foi aplicada uma camada sobre a resina acrílica com rugosidade média de 3 μm , uma maneira de simular a ação deste produto numa prótese total.

O hipoclorito de sódio 1% foi a solução eleita para ser utilizada neste estudo por ser amplamente utilizada na odontologia como desinfetante químico, tendo eficácia comprovada em relação a *C. albicans* e diversos microrganismos, sendo frequentemente citada como a solução de escolha para este fim (FELTON *et al.*, 2011; VERES *et al.*, 1985; PAVARINA *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado o poder danoso desta solução sobre as superfícies das resinas acrílicas para base de dentadura, alterando suas características (FALAH-TAFTI *et al.*, 2008), sendo pertinente investigar também seu efeito na camada de polimento líquido.

Os ciclos foram realizados com os corpos de prova imersos de forma ininterrupta na solução química, método comumente observado em diversos trabalhos, visando aumentar o estresse ao material (MA *et al.*, 1999; ORSI; ANDRADE, 2004; JIN *et al.*, 2003). Por uma carência na literatura de estudos relacionando os sistemas de polimento líquido a soluções desinfetantes, decidiu-se formar um grupo controle negativo que não sofreria as ações dessa solução e grupos controle e experimentais de 30 e 90 ciclos, em que se pode notar e comparar

o comportamento do hipoclorito de sódio 1% sobre as superfícies dos corpos de prova testados.

A imersão em saliva artificial teve como objetivo simular a influência da película adquirida salivar na adesão e formação de biofilme. A saliva humana é um fluido aquoso, transparente, composta por uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas que são secretadas pelas glândulas salivares diretamente na cavidade bucal (LIMA et al., 2010). A composição e concentração dos componentes salivares variam entre indivíduos, principalmente de acordo com o método de obtenção (estimulada ou não estimulada), dieta e horário de coleta, o que faz com que resultados discordantes sejam reportados na literatura, não existindo um consenso quanto a sua capacidade de interferir ou não interferir na adesão da *C. albicans* (DODDS; JOHNSON; YEH, 2005; JIN et al., 2004; RADFORD et al., 1998; SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1980).

Enquanto alguns autores concluem que a saliva humana aumenta a adesão de *C. albicans* a superfícies acrílicas (MILLSAP et al., 1999; VASILAS et al., 1992) devido a componentes como a mucina (DODDS; JOHNSON; YEH, 2005; EDGERTON et al., 1993; NIKAWA; HAMADA, 1990; NIKAWA et al., 1993), outros afirmam que a saliva diminui a adesão (BOSCH et al., 2003; MAZA et al., 2002; MILLSAP et al., 1999; MOURA et al., 2006; NIKAWA et al., 1992; PEREIRA-CENCI et al., 2007; SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1980; WATERS et al., 1997), devido a componentes como lisozima. Tal falta de consenso e variações na composição e concentração dos componentes salivares faz com que alguns autores contra indiquem a utilização de saliva humana para estudos *in vitro* (LEUNG; DARVELL, 1996).

Para este estudo, uma saliva artificial foi escolhida em vez da saliva humana, visando minimizar a influência das variações interindividuais na composição e dosagem de proteína salivar. Diversos são os modelos de saliva artificial propostos para simular a formação de película adquirida na colonização de microrganismos (GAL et al., 2001). Apesar de existirem fórmulas baseadas em componentes inorgânicos (AYKENT et al., 2010), é sabido que o mecanismo de adesão é determinado principalmente por moléculas orgânicas da saliva (TEUGHELIS et al., 2006). A fórmula, proposta por Hahnel et al. (HAHNEL et al., 2010), foi desenvolvida baseando-se em proteínas de maior relevância na composição salivar, em dosagem semelhante a encontrada na saliva total humana,

sendo o modelo mais encontrado na literatura envolvendo colonização de microrganismos, incluindo *C. albicans* (HAHNEL *et. al*, 2008; HAHNEL *et. al*, 2010; BUERGERS *et. al*, 2010).

Observa-se na literatura uma grande variação na concentração do inóculo microbiano empregado em estudos similares, variando desde 10^5 (NIKAWA *et al.*, 1993) a 10^8 (SEGAL; LEHRMAN; DAYANTA, 1988;), o que pode explicar divergências entre alguns resultados encontrados, pois uma concentração microbiana elevada pode favorecer uma contaminação mais intensa e extensa da superfície do corpo de prova. Neste estudo foi selecionada a concentração de 10^7 por ser a mais amplamente utilizada (CHANDRA *et al.*, 2001; MINAGI *et al.*, 1985; NIKAWA; HAMADA, 1990; NIKAWA *et al.*, 1992; RADFORD *et al.*, 1998; SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1980; WATERS *et al.*, 1997).

A temperatura e tempo de incubação para a fase de adesão selecionados foi de 90 min a 37°C preconizada por Chandra *et al.* (CHANDRA *et al.*, 2001). O período de 24 h foi estabelecido para a formação de biofilme, por ser o período máximo em que normalmente as próteses totais são utilizadas sem que o usuário realize a sua higienização.

O método de coloração com solução aquosa de Cristal Violeta é reportado como um método rápido, barato e simples para a quantificação de biofilme (STEPANOVIC *et al* 2000; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008, LI *et al.*, 2003). Entretanto, sua técnica requer um rigoroso controle na padronização das dimensões e rugosidade dos corpos de prova, uma vez que quando colonizados essas características irão influenciar na quantidade de biofilme formado e, conseqüentemente, na quantidade de corante absorvido e liberado no processo de descoloração.

Um dispositivo foi desenvolvido com o intuito de auxiliar no preparo das amostras, através da modificação de um disco de resina acrílica passível de ser utilizado em politriz metalográfica de polimento múltiplos, para fixar os corpos de prova ao invés de empregar cera pegajosa, método comumente utilizado. Ao fixar a amostra com cera pegajosa, esta poderia modificar a superfície da resina acrílica, influenciando na aderência da camada de polimento líquido ou na adesão de microrganismos. As adaptações à peça, junto a instalação de uma placa de aço na superfície do dispositivo não só permitiu fixar o corpo de prova por pressão, dispensando o uso de cera, como também ajudou a evitar que qualquer desgaste

acidental ou excessivo fosse realizado, padronizando e preservando as dimensões e o paralelismo entre as faces, além de servir como base para verificar a rugosidade e facilitar a aplicação dos sistemas de polimento líquido nos espécimes.

Além de padronizar as dimensões e características durante o preparo dos corpos de prova, outro aspecto importante no processo de quantificação do biofilme é o valor da concentração da solução aquosa de Cristal Violeta. Diversas concentrações são sugeridas, entretanto, em um estudo, Peeters et al. (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008), testou diversas diluições a fim de determinar a concentração ótima deste corante para biofilmes de *C. albicans* (24 h), incluindo a cepa SC 5314, chegando a conclusão que o valor ideal é de 0,02%, valor este também encontrado em outros estudos (PRANAB *et al.*, 2005; YUSUKE *et al.*, 2003) e portanto, adotado neste trabalho. Uma concentração inadequada causaria falhas no processo de leitura do sobrenadante uma vez que poderia facilitar ou impedir a transmissão de luz.

Quando dissolvido em água ou álcool este corante apresenta uma cor azul-violeta com um valor máximo de absorbância de 590 nm e um coeficiente de extinção de $87.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ADAMS; ROSENSTEIN, 1914). Isso significa que leituras realizadas com um comprimento de onda com um valor inferior a 590 nm não atingiriam todo o espectro da solução, podendo camuflar resultados. Neste experimento utilizou-se um comprimento de onda de ligeiramente maior (595 nm), por ser o filtro de leitura disponível no equipamento utilizado com valor mais próximo ao ideal, estando de acordo com outros trabalhos na literatura (YUSUKE *et al.*, 2003; JIN *et al.*, 2004).

De forma complementar, a análise dos corpos de prova em MEV teve como intuito demonstrar, através da sua alta resolução, as alterações ocorridas na superfícies dos corpos de prova e o aspecto do biofilme formado em cada um dos grupos avaliados. Com estas imagens pode-se relacionar as características da superfície do espécime com a quantidade de biofilme quantificado, sendo fundamental para elucidar alguns dados obtidos nos resultados.

Neste estudo, os biofilmes presentes nos corpos de prova que sofreram colonização foram fixados através de vapor de tetróxido de ósmio conforme preconizado por Quattlebaum e outros autores (QUATTLEBAUM, 1980; KITAJIMA e LEITE, 1997; ALVES *et al.*, 2002), em vez da utilização do método clássico de preparação de amostras para MEV (fixação com uma solução de glutaraldeído 3%

(V/V) preparada com 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 durante 24 h à temperatura ambiente, antes da desidratação pelas soluções de etanol), devido a sua simplicidade, conhecimento da técnica e uso na literatura.

5.2 Discussão dos Resultados

A modificação da superfície da resina acrílica através da aplicação dos sistemas de polimento líquido utilizados conseguiu reduzir a rugosidade de 3,0 μm para 0,3 μm , valor também encontrado em outros trabalhos na literatura (DAVIDI *et al.*, 2008). Apesar deste valor estar acima do limiar de adesão microbiana (0,2 μm) (QUIRYNEN *et al.*, 1990), ele é o mesmo encontrado nas superfícies polidas de uma prótese total (QUIRYNEN *et al.*, 1990; BUSSCHER *et al.*, 1984). Além disso, a redução da rugosidade significou uma queda das médias de formação de biofilme, estando em concordância com diversos estudos que associam a diminuição da rugosidade a um menor acúmulo de microrganismos (ULUSOY *et al.*, 1986; QUIRYNEN *et al.*, 1990; VERRAN e MARYAN, 1997; BOLLEN *et al.*, 1997).

Apesar da grande influência da rugosidade, existem outros fatores contribuintes no processo de adesão e formação de biofilme, como a hidrofobicidade e adsorção de proteínas salivares ao substrato (MINAGI *et al.*, 1985; NIKAWA *et al.*, 1993; RADFORD *et al.*, 1998; SAMARANAYAKE *et al.*, 1980; ZIZIS *et al.*, 2000; DAVIDI *et al.*, 2008). Analisando os grupos controle negativos nos diversos tipos de superfície estudadas, pode-se notar que apesar de ter uma rugosidade baixa (0,3 μm), o Surface Coat apresentou quantidade de biofilme formado semelhante (não houve diferença estatisticamente significativa) ao grupo rugoso (3,0 μm). Comparando as imagens em MEV das superfícies tratadas com polimento líquido (Biscover LV e Surface Coat), pode-se constatar que elas estavam íntegras e regulares, tendo aspecto semelhante em ambos sistemas (Figura 35).

Estas informações nos permite supor que o Surface Coat aparentemente sofreu uma maior adsorção das proteínas contidas na saliva artificial, a única solução que os grupos controle negativo foram expostos, influenciando na adesão de *C. albicans*, uma vez que este produto apresentou um elevado crescimento de biofilme, com diferença estatisticamente significativa em relação ao Biscover LV e ao polimento mecânico de 0,3 μm .

O que justificaria tal discrepância na formação de biofilme entre os sistemas de polimento líquido é a capacidade que o Biscover LV tem de inibir a adsorção de proteínas salivares, conforme constatado em um estudo utilizando eletroforese e imunodeteção de proteínas realizado por Davidi *et al.* (DAVIDI *et al.*, 2008). Idealmente, seria interessante realizar um experimento semelhante com Surface Coat para elucidar se ele também possui essa propriedade, entretanto, não foi objetivo deste trabalho verificar a influência da adsorção de proteínas sobre os sistemas de polimento líquido, podendo ser abordado em trabalhos futuros.

A imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 30 ciclos, em todos os tipos de superfícies tratadas, não demonstrou diferença estatisticamente significativa na formação de biofilme quando comparado com seus respectivos grupos controle, exceto para Surface Coat. Entretanto, nos grupos hipoclorito 1% de 90 ciclos, estes tratamentos de superfície apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos seus respectivos controles, exceto para Biscover LV.

Apesar de ter sido observado na literatura um trabalho demonstrando que não há diferença estatística entre o aumento da rugosidade na resina após 7 dias de imersão contínua em hipoclorito de sódio 1% (MA *et al.*, 1999), De Rezende Pinto (DE REZENDE PINTO, 2007), analisou o efeito de soluções desinfetantes na rugosidade superficial de resinas para base de dentadura, não observando diferença estatisticamente significativa entre os 1º-30º ciclos de desinfecção com hipoclorito de sódio 1%, porém observando um aumento significativo na rugosidade entre o 31º-90º ciclos.

Tais resultados são compatíveis com o presente trabalho ao se associar as alterações na rugosidade observadas à quantidade de biofilme formado, principalmente se for considerado que a imersão em soluções promoveu a degradação parcial da camada de polimento líquido (conforme observado em MEV), expondo parte da camada subjacente, que foi polida com lixa de granulação elevada, aumentando consideravelmente os valores de rugosidade superficial e conseqüentemente de biofilme.

Os trabalhos na literatura com sistemas de polimento líquido são escassos e nenhum envolve soluções desinfetantes, o que dificulta a comparação de resultados. Porém, o que sugere a exceção de Biscover LV ao não demonstrar diferença estatística entre seus grupos controle e experimental de 90 ciclos pode ser a sua capacidade de resistir a ação de substâncias químicas. Briso *et al.* (BRISO *et al.*,

2011), em um estudo avaliando a erosão sobre diversos materiais, deixaram amostras de resina composta coberta com Biscover LV imersas ininterruptamente em refrigerante e ácido clorídrico por 5 semanas e comparou com o controle negativo (não imersos) e controle-positivo (água destilada) e não foi observada diferença estatisticamente significativa da rugosidade entre os grupos. Neste mesmo estudo, avaliando as amostras de resina composta não tratadas com Biscover LV, percebeu-se um aumento das médias de rugosidade em todas as soluções químicas imersas, havendo diferença estatisticamente significativa quando comparadas com as que tiveram sua superfície tratada.

O inverso do que foi visto em Biscover LV parece ter acontecido com Surface Coat. Os resultados obtidos do grupo hipoclorito de sódio 1% de 30 ciclos tratados sugerem que este grupo é mais vulnerável a ação do hipoclorito de sódio, conforme observado nas imagens de MEV (Figuras 38 e 39) e constatado por um crescimento de biofilme com quantidade semelhante ao grupo com rugosidade de 3,0 μm .

O que pode explicar a divergência de resultados entre os sistemas de polimento líquido é, além da quantidade de adsorção de proteína salivar, suas composições químicas. Surface Coat, segundo seu fabricante, é composto de Metil Metacrilato Estabilizado, um monômero que ao ser polimerizado realiza ligações cruzadas, que tem como vantagens o seu radical de reação rápida a polimerização, insipidez, translucidez e ser menos sensível a inibição por oxigênio. Porém, quando em meio aquoso, são vulneráveis a degradação do grupo éster (VAN LANDUYT *et al.* 2007).

O Biscover LV é composto de dipentaeritritol pentacrilato, um monômero que tem uma estrutura molecular mais intrincada, com grupos funcionais altamente polimerizáveis e de ligações cruzadas, o que o torna mais resistente a degradação (VAN LANDUYT *et al.* 2007). Além disso, a baixa viscosidade do Biscover LV permite um melhor escoamento e penetração profunda nas reentrâncias rugosas, o que corresponde a uma superfície aumentada de adesão e melhor selamento (BOTTEBERG; GRABER; LAMPERT, 1996).

Entretanto, em alguns momentos, as imagens em MEV demonstraram pontos ou ranhuras nas superfícies tratadas com polimento líquido, que parecem ser provenientes da exposição das saliências da camada rugosa (3,0 μm) subjacente que não foi completamente selada. Essas imagens permitem questionar se não seria

necessária a aplicação de duas camadas, ao invés de uma, como recomendam os fabricantes.

As superfícies tratadas com polimento líquido que sofreram 90 ciclos de desinfecção com hipoclorito 1% apresentaram esses pontos com maior evidência, principalmente com o Surface Coat, por isso, um maior acúmulo de biofilme era esperado. Apesar de também ter sofrido degradação, o Biscover LV apresentou uma quantidade de biofilme compatível com a de uma superfície com polimento de 0,3 µm.

Como pode ser notado, as imagens em MEV foram de grande importância neste estudo para associar os dados obtidos através da mensuração da quantidade de biofilme formado ao seu respectivo tipo de superfície, elucidando sua integridade ou grau de degradação, contribuindo para o esclarecimento de discrepâncias ocorridas entre a formação de biofilme nos grupos controle negativo dos sistemas de polimento líquido.

Nas fotografias das superfícies que foram contaminadas, foi constatado que apesar de demonstrar o grau de colonização e estágio de desenvolvimento de *C. albicans*, seria impossível propor uma quantificação de biofilme e diferenciação dos grupos devido a grande semelhança destas imagens.

Dentro das limitações inerentes ao envolvimento com estruturas biológicas, algumas sugestões e ou inferências podem ser feitas, havendo ainda a necessidade de se pesquisar com maior profundidade e mesmo buscar elucidar questões referentes à longevidade das camadas de polimento líquido frente aos desafios químicos, seu comportamento em meio úmido e os mecanismos de adesão de *C. albicans* a esse substrato.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada neste trabalho, pode-se concluir que:

- A análise em MEV dos corpos de prova colonizados demonstrou a presença de *C. albicans* na superfície do corpo de prova sob a forma de leveduras e hifas em todos os grupos.
 - A análise em MEV dos corpos de prova não colonizados demonstrou uma degradação progressiva em todos os tipos de tratamento de superfície à medida que os números de ciclos e os desafios químicos eram aumentados.
 - O grupo Biscover LV apresentou uma quantidade de biofilme formada compatível com uma superfície lisa (0,3 μm), enquanto que Surface Coat apresentou quantidade de biofilme formada compatível com a superfície rugosa (3,0 μm).
-

Referências

REFERÊNCIAS

Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1981 Apr.;45(4):376–379.

Adams, E.Q.; Rosenstein, L. The color and ionization of crystal-violet, *J. Amer. Chem. Soc.* 1914;36(7):1452–1473.

Al-Rifaiy MQ. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of denture base acrylic resins. *The Saudi Dental Journal*. 2010 Apr.; 22(4):13–17.

Alves SB, Rossi LS, Lopes RB, Tamai MA, Pereira RM. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Invertebr. Pathol.* 2002 Oct.;81(2):70–77.

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987 May;14(3):217–227.

Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J.* 1979;147(10):267-72.

Aykent F, Yondem I, Ozyesil AG, Gunal SK, Avunduk MC, Ozkan S. Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2010 Apr.;103(4):221–227.

Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1998 Apr.;79(4):454–458.

Beckett, A. H.; Stenlake, J. B. The basis of spectrophotometry. 4o ed. Practical Pharmaceutical Chemistry. 1988; p.274-278.

Bergendal T, Isacsson G. A combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis. *Acta Odontol Scand.* 1983;41(1):33–44.

Bergendal T. Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. *Scand J Dent Res.* 1982 Jun.;90(3):227–238.

Bergman JD, Wright FA, Hammond RH. The oral health of the elderly in Melbourne. *Aust Dent J.* 1991 Aug.;36(4):280–285.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology.* 2006 Dec.;9(6):588–594.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997 Jul.;13(4):258–269.

Bosch JA, Turkenburg M, Nazmi K, Veerman ECI, de Geus EJC, Nieuw Amerongen AV. Stress as a determinant of saliva-mediated adherence and coadherence of oral and nonoral microorganisms. *Psychosom Med.* 2003 Jun.;65(4):604–612.

Bottenberg P, Gräber HG, Lampert F. Penetration of etching agents and its influence on sealer penetration into fissures in vitro. *Dent Mater.* 1996 Mar.;12(2):96–102.

Briso ALF, Caruzo LP, Guedes APA, Catelan A, Santos dos PH. In vitro evaluation of surface roughness and microhardness of restorative materials submitted to erosive challenges. *Operative Dentistry.* 2011 Jun.;36(4):397–402.

Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000 Apr.;28(2):141–149.

Budtz-Jorgensen E, Kaaber S. Clinical effects of glazing denture acrylic resin bases using an ultraviolet curing method. *Scand J Dent Res*. 1986 Dec.;94(6):569–574.

Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974;82(2):151–190.

Budtz-Jorgensen E. Denture stomatitis. III. Histopathology of trauma- and candida-induced inflammatory lesions of the palatal mucosa. *Acta Odontol Scand*. 1970 Nov.;28(5):551–579.

Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol Scand*. 1970;28(1):71-92.

Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomaterialia*. 2010 Jun.;6(6):2307–2313.

Busscher H.J., Van Pelt A.W.J., De Boer P., De Jong H.P., Arends J. Effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids and Surfaces*. 1984;9(4):319-319-331.

Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, Vergani CE, Machado AL, Spolidorio DMP. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses*. 2007 Mar.;50(2):140–147.

Chan EC, Iugovaz I, Siboo R, Bilyk M, Barolet R, Amsel R, et al. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. *J Can Dent Assoc*. 1991 Dec.;57(12):937–939.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol*. 2001 Sep.;183(18):5385–5394.

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. *Journal of Dental Research*. 2001 Mar.;80(3):903–908.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985 Dec.;22(6):996–1006.

Cilli R, de Mattos MCR, Honorio HM, Rios D, de Araujo PA, Prakki A. The role of surface sealants in the roughness of composites after a simulated toothbrushing test. *Journal of Dentistry*. 2009 Dec.;37(12):970–977.

Davidi MP, Beyth N, Sterer N, Feuerstein O, Weiss EI. Effect of liquid-polish coating on in vivo biofilm accumulation on provisional restorations: part 1. *Quintessence Int*. 2007 Jun.;38(7):591–596.

Davidi MP, Beyth N, Weiss EI, Weiss EI, Eilat Y, Feuerstein O, et al. Effect of liquid-polish coating on in vitro biofilm accumulation on provisional restorations: Part 2. *Quintessence Int*. 2008 Jan.;39(1):45–49.

De Rezende Pinto L, Efeito da desinfecção química sobre a microdureza e rugosidade superficial de resinas para base de dentaduras e resinas rígidas para reembasamento. estudo longitudinal 2007. 129 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

De Rezende Pinto L, Acosta EJTR, Távora FFF, da Silva PMB, Porto VC. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard relined acrylic resins. *Gerodontology*. 2010 Jun.;27(2):147–153.

Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1988 Oct.;60(4):467–470.

Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002 Jun.;68(6):2950–2958.

Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh C-K. Health benefits of saliva: a review. *Journal of Dentistry*. 2005 Mar.;33(3):223–233.

Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS, Levine MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect. Immun*. 1993 Jun.;61(6):2644–2652.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Archives of Oral Biology*. 1998 Dec.;43(12):999–1007.

Falah-Tafti A, Lotfi-Kamran MH. Evaluation of In Vitro Effectiveness of Seven Disinfectants over Controlling *Candida* on Complete Dentures. *World J. Med. Sci.*. 2008; 3(1):10-14.

Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Am Dent Assoc*. 2011. p. 1S–20S.

Gal JY, Fovet Y, Adib-Yadzi M. About a synthetic saliva for in vitro studies. *Talanta*. 2001 Mar. 16;53(6):1103–1115.

Greenspan D, Greenspan JS. Oral mucosal manifestations of AIDS? *Dermatol Clin*. 1987 Oct.;5(4):733–737.

Gruber RG, Lucatarto EM, Molnar EJ. Fungus growth on tissue conditioners and soft denture liners. *Rev Dent Liban*. 1968 Jun.;18(3):36–43.

Hahnel S, Ettl T, Gosau M, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. Influence of saliva substitute films on the initial adhesion of *Candida albicans* to dental substrata prior to and after artificial ageing. *Archives of Oral Biology*. 2010 May;55(5):391–396.

Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. Influence of saliva substitute films on initial *Streptococcus mutans* adhesion to enamel and dental substrata. *Journal of Dentistry*. 2008 Dec.;36(12):977–983.

Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun*. 1994 Mar.;62(3):915–921.

Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1990 Jul.;64(1):48–52.

Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc*. 1992 Jan.;123(1):46–51.

Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing--the best approach. *Br Dent J*. 1995 Jun. 10;178(11):413–417.

Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *BioTechniques*. 1997 Oct.;23(4):648–650.

Jin C, Nikawa H, Makihira S, Hamada T, Furukawa M, Murata H. Changes in surface roughness and colour stability of soft denture lining materials caused by denture cleansers. *J Oral Rehabil*. 2003 Feb.;30(2):125–130.

Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 Jul.;41(7):2961–2967.

Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Archives of Oral Biology*. 2004 Oct.;49(10):789–798.

Kitajima E.W.; Leite B. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura [Apostila do 25o curso de microscopia eletrônica de varredura]. Piracicaba: NAP/MEPA; 1997.

Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med*. 1984 Aug. 9;311(6):354–358.

Kuhn DM, CHANDRA J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun*. 2002 Feb.;70(2):878–888.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*. 2002 Dec.;5(6):608–611.

Leung VW, Darvell BW. Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *Journal of Dentistry*. 1997 Nov.;25(6):475–484.

Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 2003 Feb.;149(Pt 2):353–362.

Lima DP, Diniz DG, Moimaz SAS, Sumida DH, Okamoto AC. Saliva: reflection of the body. *Int. J. Infect. Dis*. 2010 Mar.;14(3):e184–8.

Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1993 Sep.;2(1):17–22.

Loney RW, Price RB, Murphy DG. The effect of polishing on surface roughness of tissue conditioners. *Int J Prosthodont*. 2000 Apr.;13(3):209–213.

Lopes HP, Siqueira Junior JF, Elias CN. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes HPSJ, José Freitas, editor. *Endodontia: biologia e técnica*. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999. p. 369-96.

Ma T, Johnson GH, Gordon GE. Effects of chemical disinfectants on surface characteristics and color of three fixed prosthodontic crown materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1999 Nov.;82(5):600–607.

Maza JL, Elguezabal N, Prado C, Ellacuría J, Soler I, Pontón J. *Candida albicans* adherence to resin-composite restorative dental material: influence of whole human saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Nov.;94(5):589–592.

McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect. Immun*. 1981 Jun.;32(3):1234–1241.

Millsap KW, Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999 May;75(4):351–359.

Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DMP, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside relined resin. *J Prosthodont*. 2008 Jun.;17(4):312–317.

Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect. Immun*. 1985 Jan.;47(1):11–14.

Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Del Bel Cury AA, Rodrigues-Garcia RCM. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2006 Sep.;96(3):205–211.

Närhi TO, Ainamo A, Meurman JH. Salivary yeasts, saliva, and oral mucosa in the elderly. *Journal of Dental Research*. 1993 Jun.;72(6):1009–1014.

Nevzatoğlu EU, Özcan M, Kulak-Ozkan Y, Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin Oral Invest*. 2007 Sep.;11(3):231–236.

Newton AV. Denture sore mouth: A possible aetiology. *Brit Dental J*. 1962;112:357-357-360.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont*. 1999 Feb.;12(2):153–159.

Nikawa H, Hayashi S, Nikawa Y, Hamada T, Samaranayake LP. Interactions between denture lining material, protein pellicles and *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*. 1993 Jul.;38(7):631–634.

Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1992 Nov.;68(5):804–808.

Nikawa H, Hamada T. Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans* in vitro. *Archives of Oral Biology*. 1990;35(7):571–573.

Okita N, Ørstavik D, Ørstavik J, Ostby K. In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. *Dent Mater*. 1991 Jul.;7(3):155–160.

Olsen I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol Scand*. 1974;32(5):329–333.

Orsi IA, Andrade VG. Effect of chemical disinfectants on the transverse strength of heat-polymerized acrylic resins submitted to mechanical and chemical polishing. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2004 Oct.;92(4):382–388.

Owens BM, Johnson WW. Effect of new generation surface sealants on the marginal permeability of Class V resin composite restorations. *Operative Dentistry*. 2006 Jun.;31(4):481–488.

Ozkan YK, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil*. 2002 Mar.;29(3):300–304.

Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil*. 2003 May;30(5):532–536.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 2008 Feb.;72(2):157–165.

Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, Cate ten JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Archives of Oral Biology*. 2008 Aug.;53(8):755–764.

Pereira-Cenci T, Pereira T, Cury AADB, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RCM. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007 Apr.;20(3):308–310.

Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*. 2003 Aug.;54(2):269–276.

Pranab PKM, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. Candida biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol.* 2005 May;43(3):191–208.

Quattlebaum EC, Garner GR. A technique for preparing *Beauveria* spp. for scanning electron microscopy. *Can J Bot* 1980; 58: 1700–3.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol.* 1990 Mar.;17(3):138–144.

Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1999;10(1):99–116.

Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *Journal of Dentistry.* 1998 Sep.;26(7):577–583.

Samaranayake LP, MacFarlane TW. An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology.* 1980;25(8-9):603–609.

Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology.* 1980;25(8-9):611–615.

Samaranayake LP, Leung WK, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol.* 2000. 2009 Feb.;49:39–59.

Sartori EA, Schmidt CB, Walber LF, Shinkai RSA. Effect of microwave disinfection on denture base adaptation and resin surface roughness. *Braz Dent J.* 2006;17(3):195–200.

Sayinsu K, Isik F, Sezen S, Aydemir B. Effect of blood and saliva contamination on bond strength of brackets bonded with a protective liquid polish and a light-cured adhesive. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007 Mar.;131(3):391–394.

Schmid J, Odds FC, Wiselka MJ, Nicholson KG, Soll DR. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology.* 1992 Apr.;30(4):935–941.

Segal E, Lehrman O, Dayan D. Adherence in vitro of various *Candida* species to acrylic surfaces. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1988 Dec.;66(6):670–673.

Sena NT, Gomes BPF, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006 Nov.;39(11):878–885.

Sesma N, Laganá DC, Morimoto S, Gil C. Effect of denture surface glazing on denture plaque formation. *Braz Dent J.* 2005;16(2):129–134.

Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract.* 2000 Feb. 15;1(2):28–41.

Silverglade LB, Stablein MJ. Diagnostic survey of 9,000 biopsies from three age groups: under 60 years, 60-69 and over 70. *Gerodontology.* 1988 Dec.;4(6):285–288.

Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology.* 2008 Aug.;57(Pt 8):966–973.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods.* 2000 Apr.;40(2):175–179.

Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *Journal of Dental Research*. 2009 Feb.;88(2):105–115.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct.;17 Suppl 2:68–81.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*. 2007 Aug.;52(8):761–767.

Ulusoy M, Ulusoy N, Aydin AK. An evaluation of polishing techniques on surface roughness of acrylic resins. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1986 Jul.;56(1):107–112.

Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007 Sep.;28(26):3757–3785.

Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. *Archives of Oral Biology*. 1992 Aug.;37(8):613–622.

Veres EM, Wolfaardt JF, Hnizdo E. Denture cleansers: Part I--A survey of the availability of denture cleansers in South Africa. *J. Dent. Assoc. S. Afr*. 1985 Oct.;40(10):581–583.

Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1997 May;77(5):535–539.

Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan.;97(1):79–84.

Vieira AP, Senna PM, Silva WJ, Del Bel Cury AA. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida spp.* Biofilm recolonization on liner surface. *Braz Oral Res.* 2010 Jul-Sep;24(3):342-8.

Waters MG, Williams DW, Jagger RG, Lewis MA. Adherence of *Candida albicans* to experimental denture soft lining materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 1997 Mar.;77(3):306–312.

Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil.* 1998 Jun.;25(6):416–423.

Williams DW, Potts AJ, Wilson MJ, Matthews JB, Lewis MA. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.* 1997 Feb.;26(2):83–89.

Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil.* 2005 Jul.;32(7):518–525.

Yoneyama T, Yoshida M, Ohru T, Mukaiyama H, Okamoto H, Hoshiba K, et al. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc.* 2002 Mar.;50(3):430–433.

Yusuke K. K., Abe S, Yamaguchi H, Nitta T. Detachment activity of human saliva in vitro for *Candida albicans* cells attached to a plastic plate. *J. Infect. Chemother.* 2003 Sep.;9(3):215–220.

Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000 Feb.;13(2):136–140.
