

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CRISTIANE MARIA BRASIL LEAL

**Influência da rugosidade e energia livre de superfície de
materiais para próteses removíveis a base de
polimetilmetacrilato nas propriedades do biofilme de
*Candida albicans***

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP
para obtenção do título de Doutor em Clínica
Odontológica, na área de Prótese Dental.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa

Este exemplar corresponde à
versão final da Tese defendida
pela aluna, e orientada pela Profa.
Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
GARDÊNIA BENOSSI – CRB8/8644 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

L47i Leal, Cristiane Maria Brasil, 1965-
Influência da rugosidade e energia livre de superfície de materiais para próteses removíveis a base de polimetilmetacrilato nas propriedades do biofilme de *Candida albicans* / Cristiane Maria Brasil Leal. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Célia Marisa Rizzatti Barbosa.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Rugosidade de superfície. 2. *Candida albicans*. 3. Biofilme.
I. Rizzatti-Barbosa, Célia Marisa. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Influence of the roughness and free energy surface of the materials for removable prosthesis the base of polymethylmethacrylate in the properties of biofilm of *Candida albicans*

Palavras-chave em Inglês:

Surface roughness

Candida albicans

Biofilms

Área de concentração: Prótese Dental

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Célia Marisa Rizzatti Barbosa [Orientador]

Jarbas Francisco Fernandes dos Santos

Vicente de Paula Prisco da Cunha

Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia

Dagmar de Paula Queluz

Data da defesa: 29-07-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 29 de Julho de 2011, considerou a candidata CRISTIANE MARIA BRASIL LEAL aprovada.

Prof. Dra. CELIA MARISA RIZZATTI BARBOSA

Prof. Dr. JARBAS FRANCISCO FERNANDES DOS SANTOS

Prof. Dr. VICENTE DE PAULA PRISCO DA CUNHA

Prof. Dra. RENATA CUNHA MATHEUS RODRIGUES GARCIA

Prof. Dra. DAGMAR DE PAULA QUELUZ

A **Deus**, por me conceder a vida, me dar força e saúde, me mostrar os caminhos que devo seguir me amparando sempre nos momentos difíceis e por mais uma etapa cumprida.

Aos meus pais, **Iran e Nice**, sempre ao meu lado, encorajando-me, apoiando-me, incentivando-me e dedicando-me todo amor.

Ao meu esposo, **Gilberto**, pelos incentivos dados nos momentos de fraqueza e desânimo, pelas vibrações nos momentos de alegria e pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa**, pelos ensinamentos transmitidos, dedicação, paciência, compreensão, pela forma delicada com que sempre me tratou, sempre amável e disposta a me ajudar.

Ao **Prof. Dr. Wander José da Silva**, por ter me ensinado, acompanhado e co-orientado em todas as etapas deste trabalho e pela análise estatística.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas por meio do seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na pessoa do seu digníssimo Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior** e do Diretor Associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia** pela oportunidade da realização do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia** por todo apoio, carinho e atenção.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, **Prof. Dr. Márcio de Moraes**.

À Universidade do Estado do Amazonas – UEA, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. José Aldemir de Oliveira** e da Vice Reitora **Profa. Dra. Marly Guimarães Fernandes Costa**, pela consolidação do DINTER UEA-UNICAMP em Odontologia e Clínica Odontológica, elevando os conhecimentos científicos e a titulação do corpo docente desta Instituição de Ensino Superior.

À Coordenação do Curso de Odontologia da ESA-UEA na pessoa dos seus coordenadores **Prof. Benedito Taveira dos Santos**, **Profa. Dra. Tânia Maria Chicre Alcântara** e **Prof. Dr. Marcelo Diniz Carvalho**, pelo incentivo e apoio aos docentes do curso.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM**, pela concessão de bolsa de estudo.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, por ter me acolhido e conduzido, pela paciência que teve comigo, pelos ensinamentos e pelas horas de leitura e raciocínio gastos neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Jaime A. Cury** do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela permissão de uso dos equipamentos do Laboratório de Bioquímica Oral desta instituição.

Às **Profas. Dras. Cíntia Pereira Machado Tabchoury e Livia Maria Andaló Tenuta** da área de Bioquímica Oral do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelos ensinamentos e auxílio com as atividades de laboratório.

Aos meus irmãos **Iran, Tarso, Régis, Andréa e Fábio** pela convivência fraterna, união, amizade e carinho.

À **Sra. Eliete Ap. F. L. Marim**, secretária do Departamento de Prótese e Periodontia, pela simpatia, delicadeza, disponibilidade e auxílio nas horas que precisei.

Às **Sras. Joselena Casati Lodi e Gislaine Piton**, responsáveis pelo Laboratório de Prótese Parcial Removível, pela força, carinho e companhia.

Aos **Srs. Waldomiro Vieira Filho e José Alfredo da Silva**, técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral, pela ajuda durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos **Frederico Fernandes e William Custódio** pela amizade e por toda ajuda durante o desenvolvimento desta pesquisa

Aos amigos e colegas da Pós-Graduação, **Alfonso Ayala, Antonio Pedro Ricomini, Arcelino Farias, Bruno Sotto-Maior, Carolina Meloto, Fabiana Straioto, Plinio Senna, Priscila Gomes, Silvia Lucena, Simone Guimarães, Thaís Gonçalves** pela amizade, companheirismo e agradável convivência.

Aos amigos **Dulce Finkler, Luciane Finkler e Paulo Heck** pela solidariedade, presença amiga e companheirismo.

Aos colegas **Adelcilene Veras, Ana Paula Vieira, Brigitte Nichthausser, Cláudia Andrea, Cristiano Pires, Francisco Pantoja, Joaquim Alberto, Jonas Oliveira, José Antônio Nunes de Mello, Lia Ono, Ligia Vasconcelos, Paulo Benevides, Rachid, Sybilla Dias e Tania Alcântara**, pelas orientações, incentivo e constante apoio em momentos decisivos da elaboração deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As propriedades de superfície de resinas e reembasadores a base de polimetilmetacrilato utilizados em próteses dentais removíveis podem interferir na adesão, colonização e formação do biofilme de *Candida* spp., microrganismo associado à estomatite protética. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da rugosidade e da energia livre de superfície de uma resina a base de polimetilmetacrilato e um reembasador rígido na adesão e estrutura de biofilmes de *Candida albicans*. Discos de resina acrílica termopolimerizável e de reembasador rígido à base de polimetilmetacrilato foram confeccionados nas dimensões de 10 x 2 mm. As diferentes rugosidades de superfície dos espécimes foram obtidas por meio de diferentes acabamento/polimento. A energia livre de superfície variou pela formação de películas de saliva ou plasma ou a combinação de ambos sobre os espécimes. Após a mensuração da rugosidade e da energia livre de superfície, os espécimes foram divididos aleatoriamente de acordo com os grupos experimentais. Biofilmes de *Candida albicans* ATCC 90028 foram formados sobre as superfícies e avaliados quanto à contagem celular, bioatividade e arquitetura (bio-volume, espessura média e rugosidade média) nas fases de adesão e após 48 horas. Os dados foram analisados utilizando-se a análise de variância a dois critérios seguido do teste de Tukey. O nível de significância foi de $p=0,05$. Os resultados revelaram que mesmo havendo diferenças significantes ($p<0,001$) entre os valores da rugosidade, isto não se refletiu nos parâmetros avaliados do biofilme de *C. albicans* no período de 48 horas. Não houve diferença significativa nos valores da energia livre de superfície, no entanto, a diferença das películas provocou alterações significativas do biofilme de *C. albicans* na fase de adesão e 48 horas ($p>0,05$). Pode-se concluir que a alteração da rugosidade de superfície não afeta a estrutura do biofilme de *C. albicans* de 48 horas, no entanto, a alteração da energia livre de superfície por meio da deposição de proteínas

salivares e/ou plasmáticas altera a estrutura do biofilme nas fases de adesão e 48 horas.

Palavras-chave: Rugosidade de superfície, *Candida albicans*, biofilme.

ABSTRACT

The properties of surface of the resins and liners base of polymethacrylate used in removable dental prosthesis can interfere in the adhesion, colonization and formation of biofilm of *Candida* spp., microorganism associated to the prosthetic stomatitis. The objective of this research was to evaluate the influence of the roughness and the free energy of surface of the resin the base of polymethacrylate and a rigid liner in the adhesion and structure of biofilms of *C. albicans*. Discs of the thermopolymerized acrylic resin and rigid liner to the base of polymethacrylate had been confectioned in the dimensions 10 x 2 mm. The different roughness of surface of the specimens were obtained by means of different finishing/polishing. The free energy of surface varied for the formation of pellicle of saliva or serum or the combination of both on the specimens. After the measurement the roughness and the free energy of surface, the specimens were divided randomly in accordance to the experimental groups. Biofilms of *Candida albicans* ATCC 90028 were formed on the surfaces and evaluated for cell count, bioactivity and architecture (bio-volume, average thickness and average roughness) in the adhesion phases and after 48 hours. The data were analyzed using analysis of variance with two criteria followed by the Tukey test. The significance level was $p=0,05$. The results showed that even with significant differences ($p<0.001$) between the values of roughness, it did not reflect in the parameters evaluated of biofilm of *C. albicans* in 48 hours. There was no significant difference in the values of the free energy of surface; however, the difference of the pellicles caused significant alterations of biofilm of *C. albicans* in the adhesion phase and 48 hours ($p>0,05$). It can be concluded that the alteration of the roughness of surface don't affect the structure of biofilm of *C. albicans* of 48 hours, however, the alteration of the free energy of surface by deposition of salivary and/or serum proteins modifies the structure of biofilm in the adhesion phases and 48 hours.

Key words: surface roughness, *Candida albicans*, biofilm.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 PROPOSIÇÃO	19
4 MATERIAL E MÉTODO	20
5 RESULTADO	32
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

Na cavidade oral a *Candida albicans*, microrganismo comensal, pode ser encontrada aderida na dentição, língua, bochecha e mucosa palatal além de materiais restauradores e próteses dentais removíveis (ten Cate *et al.*, 2009). Em portadores de próteses dentais removíveis onde estão presentes fatores predisponentes como higiene oral precária, imunossupressão, função salivar deficiente ou sob antibiótico terapia, a *Candida* spp. pode desencadear a estomatite induzida por prótese, patologia caracterizada por um processo inflamatório instalado na mucosa oral em contato com a prótese, conferindo-lhe um aspecto edemaciado e eritematoso (Pereira-Cenci *et al.*, 2008). Considerada o principal agente etiológico da estomatite induzida por prótese (Radford *et al.*, 1999; Pires, 2002), a *Candida albicans* tem alta capacidade de aderir e colonizar facilmente as bases das próteses removíveis formando comunidades microbianas conhecidas como biofilmes (Da Silva *et al.*, 2010).

Dentre os fatores que podem influenciar o processo de adesão e colonização de espécies de *Candida* sobre a superfície de próteses dentais removíveis estão às características de superfície dos materiais utilizados na confecção destas próteses, como a rugosidade e a energia livre de superfície (Radford *et al.*, 1997; Pereira-Cenci *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2010). Vários materiais tem sido utilizado para confecção e reembasamento de próteses dentais, dentre eles a resina acrílica a base de polimetilmetacrilato (PMMA) tem sido o material de escolha devido a estética, estabilidade dimensional, biocompatibilidade e facilidade de manipulação técnica, enquanto os materiais reembasadores rígidos diretos tem sido utilizados para adaptar a base da prótese ao rebordo residual reabsorvido devolvendo retenção e estabilidade.

As superfícies com maior rugosidade apresentam tendência de aumentar a aderência de *Candida* (Yamauchi *et al.*, 1990; Radford *et al.*, 1998; Neyzatoglu *et al.*, 2007; Pereira-Cenci *et al.*, 2007), pois as irregularidades

promovem retenção e proteção dos microrganismos contra forças que tendem a deslocá-los (Taylor *et al.*, 1998, Pereira-Cenci *et al.*, 2008). Assim, a rugosidade interfere na formação do biofilme, potencializando a área disponível para a adesão bacteriana em até três vezes (Quirynen & Bollen, 1995). Trabalhos de Bollen *et al.* (1997) e Radford *et al.* (1999) demonstraram que rugosidade de superfície da resina acrílica acima de 0,2 μm , torna a superfície passível de colonização. Dessa forma, fatores como acabamento e polimento das próteses dentais removíveis, devem ser corretamente executados para obtenção de uma lisura superficial apropriada (Ulusoy *et al.*, 1986; Berger *et al.*, 2006), pois a *Candida albicans* pode se alojar facilmente nas irregularidades das superfícies (Neyzatoglu *et al.*, 2007).

A energia livre de superfície indica a interação entre as forças de coesão e adesão e determina a capacidade de molhamento de um sólido, sendo mensurada pelo ângulo de contato formado entre o sistema sólido/líquido (Sipahi *et al.*, 2001; Pereira-Cenci *et al.*, 2007). Estudos demonstram que a energia livre de superfície tem um importante papel nas fases iniciais de adesão da *Candida albicans*, sendo que os substratos com níveis elevados de energia livre de superfície induzem a uma maior adesão (Minagi *et al.*, 1985; Sipahi *et al.*, 2001).

Além destes fatores, a adesão sobre o substrato pode ser influenciada pela presença de compostos orgânicos proteicos, secretados fisiologicamente pelas glândulas salivares (Moura *et al.*, 2006). A adsorção destas proteínas salivares sobre a superfície da resina acrílica caracteriza a formação da película adquirida que interfere na adesão de *Candida* spp. (Radford *et al.*, 1999; Moura *et al.*, 2006). A manifestação clínica da estomatite protética apresenta uma mucosa edemaciada com injúrias do epitélio oral ocasionando micro-hemorragias e conseqüentemente presença de proteínas plasmáticas que se depositam sobre o substrato também contribuindo para a composição da película adquirida (Sipahi *et al.*, 2001).

O desenvolvimento do biofilme de *Candida* spp. sobre a superfície de resinas de polimetilmetacrilato transcorre em diferentes fases, iniciando-se pela adesão, onde ocorre interação entre as superfícies do material e a *Candida* spp.

que utiliza seus filamentos extracelulares para fixação e adesão. Após esse primeiro contato com a superfície, inicia-se a fase de colonização, onde ocorre a formação de micro-colônias. O desenvolvimento celular e maturação destas colônias, que ocorre 48 horas após adesão, levam à formação de uma comunidade microbiológica altamente especializada, denominada biofilme (ten Cate *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado que a rugosidade e a energia livre de superfície estão relacionadas à fase inicial de adesão de *Candida albicans* sobre a superfície da resina de polimetilmetacrilato (Radford *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2006; Pereira-Cenci *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2010), contudo, existem poucos estudos sobre a influência destas propriedades no desenvolvimento e estrutura do biofilme. Uma maior quantidade de células aderidas poderia desenvolver um biofilme com maior biomassa e sua estrutura poderia acompanhar o relevo da superfície. Alterações na biomassa e estrutura do biofilme podem interferir na bioatividade e conseqüentemente na sua virulência.

Desta forma, considerando que em usuários de próteses dentais removíveis a prevalência de candidose ou estomatite induzida por prótese varia entre 11 e 67% (Radford *et al.*, 1999) e que a *Candida albicans* atua como principal patógeno, foi propósito deste trabalho avaliar a influência da rugosidade e da energia livre de superfície de uma resina a base de polimetilmetacrilato e um reembasador rígido na adesão e estrutura de biofilmes de *Candida albicans*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura deste trabalho abrange duas partes: a primeira, relacionada à rugosidade de superfície da resina e reembasadores para base de prótese e a segunda, relacionada a energia livre de superfície.

2.1 Rugosidade de Superfície

Leitão & Hegdahl (1981) realizaram um estudo para examinar o fenômeno de filtragem e seus efeitos sobre a expressão numérica da rugosidade. Geralmente, uma superfície é considerada rugosa quando apresenta protuberâncias e reentrâncias, com grande amplitude e curto comprimento de onda. Quando se calcula a rugosidade, o aparelho utilizado deve ser ajustado para excluir as oscilações de ondas longas e usar somente os desvios de ondas curtas sobrepondo a linha curva. Deve ser feita uma distinção entre rugosidade e curvatura. A rugosidade depende de vários fatores, alguns deles relacionados com o próprio material, sua lisura, porosidade, etc. e outros referentes ao equipamento. O valor de “cut-off” deve ser sempre indicado pois seu aumento implica em um valor maior de rugosidade. Os autores observaram que a maioria dos equipamentos possibilita a filtração das oscilações longas e permite ajustes nos valores de “cut-off” de acordo com a necessidade de cada caso.

Ulusoy *et al.* (1986), avaliaram a efetividade de diferentes técnicas de polimento. Para isto, confeccionaram amostras de uma resina acrílica autopolimerizável e de uma termopolimerizável que foram submetidas a nove diferentes técnicas de acabamento e polimento além do grupo controle (não tratado). As amostras foram confeccionadas com 1 cm de diâmetro da base, 1 cm de altura e com 0,5 cm do topo, onde realizou-se os polimentos e as leituras. Os

métodos de polimento utilizados foram: a) pedra abrasivo; b) discos abrasivos de granulação grossa, média e fina; c) cone de feltro com pasta de pedra pomes; e d) disco de pano com branco de espanha. As amostras foram divididas em nove grupos de forma que recebessem também associações dos polimentos descritos. A rugosidade foi realizada por um rugosímetro modelo C3A após o tratamento dos grupos. Os resultados de rugosidade (Ra) mostraram que o menor valor foi obtido quando da utilização de todos os materiais para polimento, e em ordem decrescente de granulação, sendo que os outros grupos que não utilizaram todos os métodos de polimento apresentados, obtiveram os resultados melhores quando utilizou-se uma ordem de polimento de granulação decrescente. Quando foram comparados os valores de rugosidade das resinas acrílicas utilizadas frente ao mesmo tratamento, os autores verificaram que não houve diferença estatística. Concluíram que nenhum passo deve ser negligenciado durante o acabamento e polimento, pois isto pode influenciar diretamente na rugosidade de superfície do material.

Yamauchi *et al.* (1990) examinaram o efeito de diferentes rugosidades efetuadas na superfície de uma resina acrílica com a adesão de microrganismos. Espécimes de uma resina acrílica para base de prótese receberam três diferentes tipos de acabamento e polimento ficando com a rugosidade mensurada em 1,12 μm , 0,9 μm e 0,22 μm . Os espécimes tiveram o ângulo de contato mensurado utilizando gota de água destilada. Em seguida, foram incubados em meios com diferentes espécies de *Streptococci*, *Bacteroides* e *Candida albicans*. Os resultados indicaram que a lisura de superfície das resinas para base de prótese é importante no controle do biofilme.

Quirynen *et al.* (1990) após estudos clínicos, verificaram que a elevada energia livre de superfície e o aumento da rugosidade superficial do substrato podem facilitar o acúmulo de placa subgengival. Para isto, duas tiras de fluoetilenopropileno (FEP) e uma de acetato de celulose (CA) (polímeros de energia livre de superfície de 20 e 58 erg/cm^2 , respectivamente), foram presa à

superfície vestibular de incisivos centrais de 16 voluntários. Metade da superfície da tira foi polida ($Ra \pm 0,1 \mu\text{m}$) e outra metade foi deixada rugosa ($Ra \pm 2,2 \mu\text{m}$), foram feitas leituras dos índices de placa bacteriana no 3º e 6º dia. Observou-se no 3º dia uma diferença significativa no acúmulo de placa bacteriana comparando a superfície rugosa com a lisa. Entretanto, no 6º dia menor quantidade de placa bacteriana foi registrada na superfície lisa do FED, quando comparada com a superfície lisa do CA. Entre a superfície FED rugosa e a superfície CA rugosa, não foi verificada diferença estatística. Os autores concluíram que a influência da rugosidade de superfície sobre o acúmulo e a composição da placa é superior à energia livre de superfície.

Quirynen & Bollen (1995) realizaram uma revisão de literatura sobre a influência da rugosidade superficial e da energia livre de superfície no processo de adesão bacteriana. Conforme os autores, a rugosidade superficial promove a formação e maturação da placa, enquanto a energia livre de superfície é coletora de placa adicional, ligando esta mais fortemente e promovendo a seleção de colônias bacterianas específicas. Apesar de existir uma interação entre rugosidade superficial e a energia livre de superfície, a influência da primeira é superior no mecanismo de formação de placa bacteriana. Os autores verificaram ainda que nas superfícies irregulares, as bactérias uma vez fixadas, podem sobreviver mais tempo porque estarão protegidas das forças naturais de remoção e das medidas de higiene oral. Além disto, a rugosidade superficial aumenta a área disponível para adesão bacteriana potencializando-a em até três vezes. Ficou concluído que todos os esforços devem ser feitos para obtenção de superfícies lisas e bem acabadas minimizando a formação de placa bacteriana e consequentemente reduzindo a ocorrência de doenças na cavidade bucal.

Bollen *et al.* (1997) em uma ampla revisão de literatura, compararam a rugosidade superficial de resina acrílica, com o seu limiar para retenção de placa bacteriana. Os autores, com base nesta revisão da literatura, puderam constatar que dependendo do polimento superficial que a resina acrílica recebe os valores

de rugosidade variam muito, podendo até mesmo aumentar este valor caso seja utilizado lixa de granulação 400 ($R_a = 0,75 \mu\text{m}$). Porém quando utilizadas partículas de diamantes estes valores de rugosidade podem diminuir drasticamente ($R_a = 0,03$). Segundo os autores, para que ocorra uma aderência de microrganismos, uma rugosidade mínima de $0,2 \mu\text{m}$ se faz necessária para que estes permaneçam no material, sendo que alguns fatores como contaminação do material, adesão bacteriana inicial, fixação bacteriana e colonização superficial, são contribuintes para a adesão.

Radford *et al.* (1997) estudaram as características de superfície de três materiais (resina acrílica termopolimerizável, Molloplast B e Novus) após sofrerem desgaste com instrumentos rotatórios utilizados na clínica odontológica. Na resina acrílica utilizou broca de tungstênio e de aço e o Molloplast foi desgastado com as brocas que acompanham seu kit. Os autores concluíram que a broca de tungstênio produziu a superfície mais lisa do que a broca de aço. A maior rugosidade foi encontrada na superfície do reembasador Molloplast B que sofre desgaste com as brocas de seu kit. Cada instrumento giratório produz sua própria característica na superfície da resina, isto alerta para o uso correto da broca de desgaste dos materiais utilizados nas bases de próteses pois a rugosidade de superfície pode promover adesão e colonização de microrganismos.

Verran & Maryan (1997) realizaram um estudo sobre a retenção de *Candida albicans* em diferentes superfícies de resina acrílica, com a intenção de determinar o efeito direto da rugosidade de superfície desses materiais sobre as infecções induzidas por prótese. Foram confeccionadas padrões em resina acrílica, dos quais um grupo teve a superfície lisa e polida e outro, para a obtenção de uma superfície rugosa, foi desgastado manualmente com lixa de granulação média. A mensuração da rugosidade de superfície das amostras foi realizada através de um perfilômetro. As amostras foram incluídas em culturas de *C. albicans*, e após foram avaliadas quanto à proliferação e fixação destes microrganismos em sua superfície. Os valores de rugosidade encontrados para a

resina acrílica foram 0,02 µm para resina lisa, 1,26 µm para a resina rugosa e 1,96 µm para resina prensada contra gesso selado com verniz. Quanto à adesão de microrganismos, os resultados mostraram um número bem menor de células aderidas nos grupos de superfície lisa. Os grupos de superfície rugosa não só diferiram estatisticamente em relação aos grupos de superfície lisa, mas também entre si. Os autores ressaltaram a importância das superfícies das próteses em resina acrílica serem mantidas o mais lisas e regulares possível, com o intuito de diminuir a retenção de microrganismos, prevenido a ocorrência de infecções locais e deterioração precoce de prótese

Radford *et al.* (1998) avaliaram o efeito de três diferentes tratamento de superfície realizados sobre espécimes de uma resina acrílica e dois reembasadores macios sobre a aderência de *Candida albicans*. Também foi estudado o efeito da película de saliva na adesão de *C. albicans*. O tratamento de superfície foi executado com instrumentos rotatórios apropriados. Os autores concluíram que a rugosidade de superfície aumentou a adesão de *C. albicans*, no entanto, a película de saliva reduziu consideravelmente a adesão e diminui o efeito da rugosidade de superfície e da energia livre de superfície.

Taylor *et al.* (1998) compararam a retenção de bactérias e fungos sobre as superfícies polidas da resina acrílica Pala-press (Kulzer and Co., Hamburg, Germany) e de ligas de cromo-cobalto jateadas com partículas de óxido de alumínio de 50 e 250 µm e eletropolidas em tanque eletrolítico. As amostras destes materiais tiveram a rugosidades superficiais mensuradas e foram incubados por 1 h a 37°C com suspensão de células de *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus oralis*. As células aderidas às superfícies foram observadas em microscópio epifluorescente e registrada para cada amostra. Concluíram que o aumento na rugosidade superficial facilitou a retenção de fungos tanto na resina acrílica como na liga metálica, entretanto, a retenção bacteriana ocorreu nos microdefeitos e mesmo nas superfícies polidas. Relataram que as técnicas de polimento laboratorial não apresentam padronização e uma superfície

considerada lisa visualmente, pode ser microretentiva e favorecer a colonização microbiana.

Zissis *et al.* (2000) analisaram a rugosidade de 20 materiais utilizados para confecção de próteses totais, sendo quatro resinas para base de próteses, nove reembasadores de alta consistência e sete reembasadores de baixa consistência. Os resultados dos valores de rugosidade foram entre 3,4 a 7,6 μm para o grupo de material de base e de 0,7 a 4,4 μm para os reembasadores de alta consistência. Os reembasadores de baixa consistência autopolimerizáveis e fotopolimerizáveis apresentaram rugosidade de 0,7 a 3,5 μm , enquanto os polimerizados com banho de água apresentaram rugosidade de 3,5 a 4,0 μm . Os autores afirmaram que os valores de rugosidade exibidos por todos os materiais testados (valores maiores que 0,7 μm) podem indicar uma forte possibilidade de acumularem placa, mas que todos os valores acima de 0,2 μm certamente acumularão considerável quantidade de placa.

Anusavice (2005) definiu acabamento como o processo de remoção de defeitos ou riscos na superfície, criados durante o processo de contorno, por meio do uso de instrumentos de corte, desgaste ou ambos. Polimento foi definido como o processo de produção de uma superfície lustrosa ou brilhante sobre o material. O acabamento e polimento promovem três benefícios na prótese dental: saúde, função e estética. A condição de saúde pode ser obtida evitando o acúmulo de alimentos e bactérias na superfície, além de facilitar a manutenção da higiene. A função é melhorada quando as superfícies lisas dos dentes e da prótese promovem melhor deslocamento do bolo alimentar e dos contatos entre os dentes antagonistas. Esteticamente o acabamento promove, principalmente nas áreas visíveis, como nos dentes anteriores, compatibilidade com as estruturas remanescentes adjacentes. Segundo o autor, o processo de polimento é uma das etapas mais refinadas do acabamento.

Berger *et al.* (2006) compararam o efeito do polimento de três kits de polimento realizado no consultório e o polimento convencional efetuado em quatro

resinas para base de prótese. Espécimes de resina acrílica: autopolimerizável, termopolimerizável, polimerizável no microndas e por processo de injeção, foram polidos com os kits para polimento Axis Dental, Brasseler e Shofu de acordo com as recomendações do fabricante. O polimento convencional foi realizado com pedra pomes e composto para polimento. Os autores observaram que a resina acrílica autopolimerizável foi a que manteve a superfície mais rugosa após todos os tipos de polimento. Não houve diferença significativa entre os polimentos realizados pelos kits. O polimento convencional obteve melhor resultado que os realizados com kit de polimento. Assim, concluíram que o polimento convencional deve ser usado após ajustes realizados na superfície da resina acrílica e que o tempo não é fator para justificar o uso de kit de polimento no consultório.

Nevzatoglu *et al.* (2007) avaliaram a rugosidade de superfície e a aderência de *C. albicans* em resinas acrílicas para base de prótese e reembasador resiliente a base de silicone com diferentes tratamento de superfície. Quatro resinas acrílicas (três termopolimerizável e uma autopolimerizável) e cinco reembasadores resiliente a base de silicone (dois termopolimerizável e três autopolimerizável) foram utilizados neste estudo. Os espécimes foram processados contra o vidro ou gesso dental ou receberam acabamento com broca carbide de tungstênio. A rugosidade de superfície foi mensurada com um perfilômetro. Todos os espécimes foram limpos no ultra-som, esterilizados na autoclave e em seguida, contaminados com *C. albicans* para avaliação da adesão. Os materiais processados contra o vidro tiveram a menor rugosidade de superfície e a menor adesão de *C. albicans*. Em todos os tipos de tratamento de superfície as resinas acrílicas aderiram menos *C. albicans* que as bases de silicone.

Pereira-Cenci *et al.* (2008) fizeram uma revisão de literatura em que discutiram os fatores chave para o controle da adesão de *Candida* ssp. que estão associados a estomatite protética. Adesão de *Candida* na superfície da prótese é o primeiro passo para desenvolvimento do biofilme que pode levar a um processo infeccioso ao entrar em contato com a mucosa. Sem esta aderência,

microrganismos poderiam ser removidos da cavidade oral quando a saliva ou alimentos fossem engolidos. Além das propriedades de superfície, outros fatores como composição da saliva, interação entre os microrganismos, a hidrofobicidade da superfície celular e uso de reembasadores para base de prótese devem ser levados em consideração. A rugosidade de superfície influencia diretamente na adesão inicial de microrganismo nas superfícies, desenvolvimento do biofilme e colonização de *Candida* ssp. Material com maior rugosidade apresenta maior número de células, pois as irregularidades promovem retenção e proteção dos microrganismos contra forças que tendem a deslocá-los. A imersão da resina em saliva diminui a influência da rugosidade de superfície e energia livre de superfície na adesão de *Candida* ssp. No entanto, estudos divergem quanto a influência da saliva na adesão de *Candida* ssp. às resinas acrílicas, isto provavelmente se deve a diferente forma como a saliva é coletada, com estimulação ou sem estimulação, resultando em diferentes viscosidade e composição proteica. A energia livre de superfície tem um importante papel na fase inicial de adesão.

Hahnel *et al.* (2009) examinaram potenciais alterações e influência das propriedades de superfície de resina para base de prótese na adesão de *Candida albicans* após tratamento de superfície ou envelhecimento artificial. Espécimes de uma resina acrílica e um composto veneer receberam o tratamento de superfície com lixas de papel de diferentes granulações e o envelhecimento foi realizado por meio de termociclagem sendo armazenado em etanol ou saliva por um período de 7 e 90 dias. A rugosidade superficial e a energia livre de superfície eram mensuradas antes e após cada tratamento. Os espécimes foram incubados, por duas horas, metade em PBS e outra metade em saliva por duas horas para formação da película adquirida. Em seguida foram incubados em suspensão de *Candida albicans* por 2,5 h e quantificado o número de células aderidas. Para os autores, a termociclagem não afetou a rugosidade de superfície do substrato, promoveu um leve aumento na energia livre de superfície e um significativo aumento na adesão de *Candida albicans*. A película de saliva influenciou a adesão de *Candida albicans*. Concluíram que não houve correlação entre a rugosidade

superficial e a energia livre de superfície do substrato na adesão de *Candida albicans*.

ten Cate *et al.* (2009) relataram que a *Candida albicans* é comumente encontrada na cavidade oral não só de adulto, mas também de criança, com uma prevalência reportada entre 15 a 75%. Ela pode ser encontrada aderida na dentição, língua, bochecha e mucosa palatal além de materiais restauradores e próteses dentais removíveis. Em pacientes com saúde sistêmica e oral, a presença de *Candida* raramente causa doença. Em materiais com superfície rugosa há uma maior aderência de *Candida albicans* e dentro das rugosidades, elas ficam menos sensíveis aos tratamentos antifúngicos.

2.2 Energia Livre de Superfície

Busscher *et al.* (1983) realizaram um estudo onde verificaram o efeito da pressão de deposição da gota séssil sobre a determinação da energia livre de superfície por meio da leitura do ângulo de contato. Os autores utilizaram como líquidos de referência o α -bromonaftaleno, o n-propanol e a água destilada. Entre os materiais que tiveram suas superfícies avaliadas estava a resina acrílica. Os autores concluíram que dentre os métodos utilizados para a mensuração da energia livre de superfície, a pressão empregada na deposição da gota deve ser um fator a ser considerado. Com metodologia semelhante, Van Der Valk *et al.* (1983) e Schakenraad *et al.* (1986) avaliaram a relação entre energia livre de superfície de polímeros e o crescimento celular de fibroblastos sobre estas superfícies. Os resultados obtidos pelos dois trabalhos são antagonistas uma vez os autores Van Der Valk *et al.* (1983) afirmaram que não há relação entre a energia livre de superfície e o crescimento celular.

Busscher *et al.* (1984) analisaram o efeito da rugosidade superficial de polímeros sobre o ângulo de contato de diferentes líquidos. O polimetilmetacrilato

foi um dos polímeros avaliados. Os autores ressaltaram que a rugosidade não produz efeitos sobre o ângulo de contato quando seu valor se encontra abaixo de 0,1 μm . Ainda relatam que há uma tendência inversamente proporcional entre a rugosidade superficial e o valor do ângulo de contato para a superfície analisada.

Kilani *et al.* (1984) avaliaram através da mensuração do ângulo de contato de água destilada e de saliva artificial o molhamento de diferentes materiais utilizados na confecção de próteses dentárias. Os valores médios obtidos para a resina acrílica polimerizada em banho de água para água destilada foi de $64,3 \pm 3,8^\circ$. Os autores ainda discutiram a relação inversamente proporcional entre rugosidade e o ângulo obtido.

Minagi *et al.* (1985) verificaram *in vitro* os efeitos da hidrofobia da superfície dos substratos na aderência fúngica utilizando a *Candida albicans* e *Candida tropicalis* como agentes colonizadores e uma variedade de resinas acrílicas comumente utilizadas na confecção de próteses. Nesse estudo, foram encontrados valores de ângulo de contato que variam de 90° a 69° para resinas acrílicas termopolimerizáveis e valores de 76° a 73° para resinas acrílicas autopolimerizáveis. Com o aumento da energia livre de superfície dos espécimes de resina acrílica houve um aumento da aderência de *Candida albicans* e um decréscimo da aderência de *Candida tropicalis*. No cálculo de variações de energia livre acompanhando a aderência, uma maior tendência de aderência foi acompanhada por uma maior redução na energia livre de superfície em ambas as espécies.

Monsenego *et al.* (1989) utilizaram a leitura de ângulo de contato de água destilada sobre a superfície de espécimes de resina acrílica para mensuração do molhamento destes materiais. O valor médio obtido para a resina acrílica polimerizada em banho de água foi de 64° . Os autores relataram a queda deste valor após a imersão e armazenamento dos espécimes em água destilada.

Quirynten *et al.* (1990) relatou que a adesão inicial de microrganismos sobre a superfície da prótese ocorre por interação específicas como ligações

iônicas e interações tipo pontes de hidrogênio. Posteriormente à interação com a superfície da prótese, o microrganismo utiliza filamentos extracelulares para fixar-se à mesma e inicia-se a fase de colonização da superfície, onde ocorre o desenvolvimento de micro-colônias e a formação de biofilme. Durante o processo de colonização, o microrganismo, para alcançar e interagir com o substrato acrílico necessita remover a película adquirida, formada pela adsorção seletiva de glicoproteínas salivares, que se forma imediatamente após o contato da saliva com a superfície da prótese.

Nikawa *et al.* (2000) pesquisaram a formação do biofilme de 10 isolados de *Candida*, sendo 4 isolados de *C. albicans*, 3 de *C. glabrata* e 3 de *C. tropicalis*, sobre espécimes de resina acrílica com películas de diferentes concentrações de plasma e saliva (100% saliva, 95% saliva + 5%plasma, 80% saliva + 20% plasma, 50% saliva + 50% plasma e 100% plasma) e um controle com água destilada. Os espécimes foram imersos nestas soluções por 60 min a 37°C e em seguida incubados com os isolados de *Candida* por 120 min para promover a adesão e por 72 h para análise do biofilme maduro. Os autores concluíram que a bioatividade do biofilme varia dependendo do isolado de *Candida* e da película e que quanto maior a concentração de plasma na película, maior a formação de biofilme de *Candida* sobre a superfície da resina. Assim, a inflamação no meio oral pode facilitar a colonização de fungos no acrílico das próteses dentais removíveis.

Sipahi *et al.*(2001) afirmaram que a formação da película adquirida sobre a superfície da prótese está diretamente associada à sua capacidade de molhamento que é regulada pela energia livre de superfície. Assim, a presença da camada de compostos orgânicos interfere diretamente sobre a superfície de resinas acrílicas utilizadas para a confecção de próteses, influenciando a adesão de *candida* spp. sobre o material. Os autores realizaram um estudo onde avaliaram o efeito da saliva e da energia livre de superfície dos diferentes materiais de bases de prótese, utilizando cinco tipos de resinas e dois tipos de materiais de bases para prótese, onde confeccionaram e poliram espécimes de

cada material seguindo um único padrão. A saliva total foi coletada pela estimulação de um voluntário saudável. A energia livre de superfície dos materiais foi mensurada antes e depois da formação da camada orgânica sobre os espécimes. Para tanto, foram mensurados o ângulo de contato de diferentes substâncias líquidas (di-iodometano, etileno glicol e formamida). A energia livre de superfície foi calculada usando uma equação específica. A diferença das energias entre os diferentes materiais foi calculada por método estatístico. Resinas acrílicas levemente tratadas foram as que apresentaram maior capacidade de molhamento. O tratamento da superfície com saliva apresentou um efeito homogêneo em termos de energia livre de superfície dos materiais avaliados, e as propriedades adesivas dos microrganismos foram influenciadas pelo substrato.

Gindl *et al.* (2001) compararam diferentes métodos para o cálculo da energia livre de superfície através do ângulo de contato. Os autores discutem o uso de cinco diferentes equações matemáticas utilizadas para a obtenção da energia livre de superfície de sólidos, onde se avaliou a energia livre de superfície de uma amostra de madeira. Entre os métodos propostos estava o preconizado por Neumann *et al.* (1974) que consiste da utilização de um líquido com tensão superficial conhecida na avaliação da energia livre. Os resultados mostram que o fator principal está na correta escolha dos líquidos empregados devido a sua interatividade com a superfície a ser avaliada.

Combe *et al.* (2004) desenvolveram uma metodologia padrão para mensurar a energia livre de superfície, e seus componentes, dos biomateriais dentais. O ângulo de contato de cada uma das quatro amostras de dois materiais – polietileno de baixa densidade e polimetilmetacrilato – foram medidos três vezes em cada um dos seis líquidos (1-bromonafitalina, diiodometano, etileno glicol, formamida, glicerol e água destilada). As estimativas críticas da tensão superficial foram obtidas pelos traçados de Zisman. Os dados foram analisados pelo método do último(mínimo)-quadrado para estimar os componentes da energia livre de superfície. As estimativas foram feitas igualmente para cada um das 12 tríplice

gota líquida e pela probabilidade máxima e por análises Bayesian. Os resultados mostraram que o uso de tríplexes gotas líquidas poderia trazer estimativas errôneas dos componentes da energia livre de superfície. Um protocolo teste foi sugerido em que eram usados múltiplos líquidos, e empregados múltiplos métodos de análise estatística. Os autores concluíram que uma elevada energia livre de superfície é desejada quando requer adesão, mas indesejada se a resistência a placa bacteriana é necessária.

Jin *et al.* (2004) examinaram o efeito da saliva humana total e açúcares dietéticos, glicose e galactose, na adesão e formação do biofilme de *Candida albicans*. Desenvolveram biofilme do isolado 192 887 g de *C. albicans* inoculado em YNB contendo 100mM de glicose ou 500mM de galactose e base nitrogenada de levedura (YNB) contendo ou não saliva humana total. A análise foi usando ATP (adenosina trifosfato) bioluminescência, tetrazolium ensaio de redução (XTT) e avaliação convencional da unidade formadora de colônias (CFU). Os resultados mostraram que comparada com a glicose - meio suplementado com 100mM, a galactose contendo meio de 500mM gerou consistentemente níveis inferiores da adesão e formação do biofilme, mas um ritmo mais elevado de desenvolvimento do biofilme sobre o tempo (96 h). A presença da película imobilizada de saliva teve pouco efeito na adesão e formação do biofilme, a adição de saliva ao meio da incubação afetou quantitativamente a formação do biofilme especialmente no 3º e 4º dias, sem nenhum efeito significativo na adesão. Os autores concluíram que a formação do biofilme de *Candida albicans* dentro do ambiente oral parece ser modulada às extensões de variação de fatores dietéticos e salivares.

Ramage *et al.* (2004) avaliaram a contribuição do biofilme de *Candida* na etiologia da estomatite protética. Amostras da resina acrílica de próteses de pacientes com estomatite protética foram retiradas e analisadas no microscópico eletrônico. Os biofilmes mostraram com tendência a aderir nas irregularidades e rugosidades da resina acrílica. O isolado de *C. albicans* foi hábil para formar biofilme “*in vitro*”, no entanto, diferenças na extensão da formação do biofilme

foram observadas para os diferentes isolados de *Candida* adquirido do mesmo paciente. A presença de películas de saliva e plasma aumentaram a adesão inicial, mas tiveram um pequeno efeito na formação total do biofilme. Os autores concluíram que o biofilme de *Candida* tem importante função na estomatite protética.

Serrano-Granger *et al.* (2005) pesquisaram se as pequenas variações na composição da resina de PMMA fazem diferença no grau de adesão de *C. albicans* e se a diferença encontrada na energia de superfície das resinas acrílicas tinha papel importante na adesão de *C. albicans*. Onze resinas de PMMA foram utilizadas. Após ensaio de adesão, a contagem celular foi realizada no microscópio óptico fluorescente e a energia de superfície calculada pelo método do ângulo de contato. A adesão de *C. albicans* variou entre as diferentes resinas de PMMA, possivelmente isto se deve a ação de produtos residuais pós-polimerização. Não foi encontrada relação entre a energia livre de superfície e a adesão de *C. albicans*.

Moura *et al.* (2006) estudaram a influência dos métodos de polimerização das resina acrílicas para base de prótese e a presença da película de saliva sobre a adesão de *Candida* spp. Os espécimes de uma resina termopolimerizável (Clássico) e outra polimerizável no microondas (OndaCryl) tiveram a rugosidade superficial mensurada usando um perfilômetro e a energia livre de superfície foi mensurada pelo ângulo de contato da gota de água. Para o ensaio de adesão foram utilizadas quatro espécies de *cândida* (*albicans*, *tropicalis*, *dublinskiensis* e *glabata*) e a presença ou não da película de saliva. Os autores concluíram que a película de saliva reduziu a aderência de *Candida* spp. e que a rugosidade de superfície e a energia livre de superfície não tiveram influência no índice de adesão.

Pereira-Cenci *et al.* (2007) pesquisaram a influência da energia livre de superfície, rugosidade de superfície, película de saliva e bactéria na adesão de *Candida* em materiais para base de prótese. A rugosidade de superfície e a

energia livre de superfície dos espécimes de dois reembasadores macios e duas resinas acrílicas foram mensuradas. Antes do ensaio de adesão de *C albicans* e *C glabata* os espécimes foram divididos em grupos de acordo com a formação ou não da película adquirida de saliva e precolonização ou não de bactéria. Os autores concluíram que a colonização total foi significativamente diminuída pela película de saliva e influenciada precolonização de bactéria. A rugosidade de superfície aumentou a adesão de *Candida* e a energia livre de superfície não afetou a adesão de *Candida*.

Da Silva *et al.* (2010) avaliaram a bioatividade e a arquitetura do biofilme de *Candida albicans* desenvolvido na superfície de uma resina acrílica a base de PMMA. Para isto, os espécimes tiveram a rugosidade de superfície e energia livre de superfície mensuradas. O biofilme de duas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028 e SC 5314) foram desenvolvidos nas superfícies dos espécimes e avaliados após 24, 48 e 72 h após adesão. A bioatividade dos biofilmes foi mensurada pela técnica modificada de redução mitocondrial do XTT e a arquitetura do biofilme analisada com o microscópio de varredura confocal a laser. Os autores verificaram que a rugosidade de superfície e a energia livre de superfície não influenciaram no desenvolvimento do biofilme, houve diferença na bioatividade e arquitetura dos biofilmes das diferentes cepas de *Candida albicans*, assim como, nos biofilmes avaliados nos diferentes tempos.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência da rugosidade e da energia livre de superfície de uma resina a base de polimetilmetacrilato e um reembasador rígido na adesão e estrutura de biofilmes de *Candida albicans*.

4.1 Delineamento Experimental

Este estudo foi realizado com distribuição aleatória dos espécimes e análise cega (quanto à contagem celular). Os fatores de estudo foram rugosidade e energia livre de superfície. As variáveis respostas foram quantificação celular, bioatividade e estrutura do biofilme (bio-volume, espessura média e rugosidade média) de *C. albicans* ATCC 90028. Espécimes de resina a base de polimetilmetacrilato (PMMA) ou material reembasador rígido serviram como substrato para o desenvolvimento dos biofilmes. A rugosidade de superfície dos materiais foi produzida por diferentes processos de acabamento e polimento. A energia livre de superfície foi mensurada após a formação de diferentes películas proteicas. Após tratamento de superfície, os espécimes foram divididos aleatoriamente de acordo com os grupos experimentais e sobre suas superfícies foram desenvolvidos biofilmes de *Candida albicans* que foram analisados nas fases de adesão e 48 h. As análises dos biofilmes foram executadas por meio da quantificação celular, bioatividade e estrutura do biofilme (bio-volume, espessura média e rugosidade média).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP com certificado de aprovação número 065/2009.

4.2 Confeção dos Espécimes

Os espécimes de resina a base de PMMA com dimensões de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, foram confeccionados utilizando-se uma mufla de aço inox específica contendo orifícios nestas dimensões (Fig. 2). A confecção dos espécimes no que se refere a proporção pó/líquido, manipulação e polimerização da resina (banho de água quente por 9 h a 71°C) foram realizadas conforme instrução do fabricante.



Figura 2 – Mufla de aço inox para confecção dos espécimes

Os espécimes do material reembasador foram confeccionados sobre discos de PMMA com dimensões de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura que foram obtidos desgastando-se 1 mm do espécime da resina PMMA de 10 x 2 mm na politriz horizontal (model APL-4; Arotec, São Paulo, Brasil) com lixa 320 por 7 min. Com auxílio de uma matriz metálica retangular, contendo seis orifícios nas dimensões de 10 mm de diâmetro por 2 mm de espessura, discos de resina PMMA (10 x 1 mm), foram posicionados nos orifícios e sobre eles vertido o material reembasador que em seguida foi prensado com uma placa de vidro até a polimerização final do material (Fig. 3).

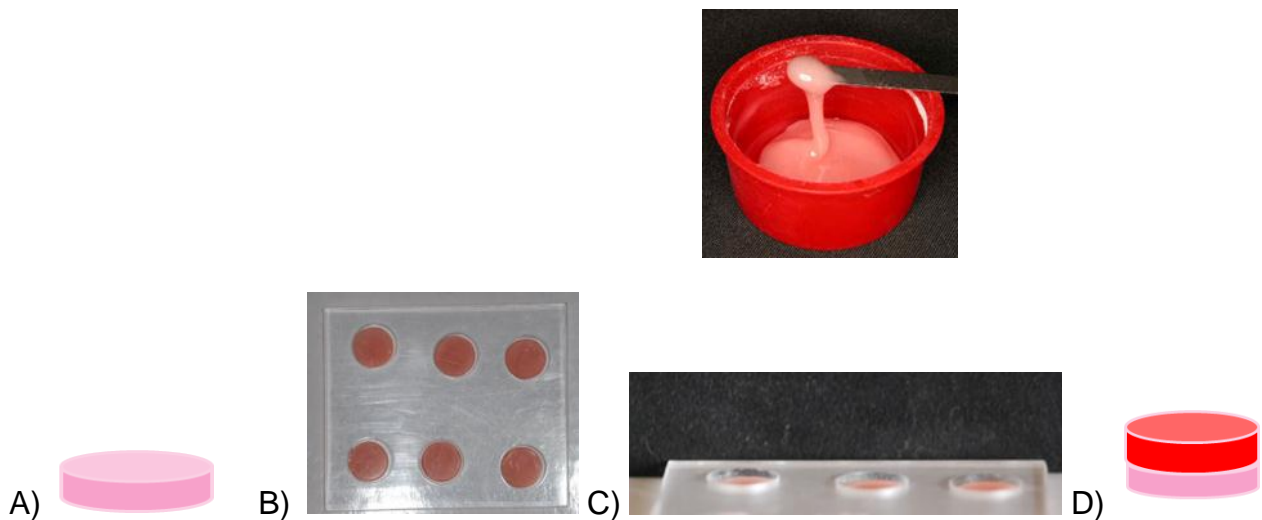


Figura 3 – A) Base de PMMA medido 10 x 1 mm. B) Matriz metálica retangular com orifícios de 10 x 2 mm e base de PMMA posicionada no interior dos orifícios. C) Reembasador que foi vertido na matriz e prensado com placa de vidro. D) Espécime de reembasador medindo 10 x 2 mm.

Os espécimes destinados ao estudo da influência da rugosidade de superfície no desenvolvimento do biofilme receberam diferentes acabamentos e polimentos. Os espécimes da resina de PMMA foram divididos em 4 grupos: grupo de $R_a = 0,30 \mu\text{m}$ recebeu acabamento com uso progressivo de lixas d'água nº 320, 400 e 600 em politriz horizontal, sendo 2 min para cada lixa. O grupo de $R_a = 0,12 \mu\text{m}$ recebeu adicionalmente polimento com pedra pomes e branco de Espanha em disco de feltro por 1 min. O grupo $R_a = 0,17 \mu\text{m}$ recebeu acabamento com uso progressivo de lixas d'água nº 320, 400, 600 e 1200 em politriz horizontal e o grupo de $R_a = 0,11 \mu\text{m}$ recebeu acabamento com uso progressivo de lixas d'água nº 320, 400, 600 e 1200 em politriz horizontal e polimento com pedra pomes e branco de Espanha em disco de feltro por 1 min. Os espécimes do material reembasador foram divididos em 2 grupos: $R_a = 0,31 \mu\text{m}$ que recebeu acabamento com uso progressivo de lixas d'água nº 320, 400 e 600 e $R_a = 0,13$

µm recebeu adicionalmente polimento com pedra pomes e branco de Espanha em disco de feltro por 1 min.

Destaca-se que os valores de rugosidade foram obtidos após o polimento e acabamento para todos os espécimes de resina e reembasador.

Todos os espécimes destinados ao estudo da influência da energia livre de superfície no desenvolvimento do biofilme foram submetidos ao acabamento com uso progressivo de lixas d'água nº 320, 400 e 600 em politriz horizontal 2 min para cada lixa e polimento com pedra pomes e branco de Espanha em disco de feltro por 1 min.

Todos os espécimes foram submetidos à limpeza no ultrassom (Thornton T 740, Thornton-Inpec Eletrônica Ltda, Vinhedo, Brasil) por 20 min e em seguida armazenados em água destilada a 37°C por 12 h para eliminação do monômero residual. Após estes procedimentos foi mensurada a rugosidade de superfície dos espécimes.

4.3 Avaliação da Rugosidade de Superfície

A rugosidade de superfície (Ra) dos espécimes de resina acrílica e reembasador foram mensuradas usando um rugosímetro (Surfcorder SE 1700; Kosaka Laboratory Ltd, Kosaka, Japan) com o diâmetro da ponta ativa de 2 µm, precisão de 0,01 µm de resolução e velocidade de 0,5 mm/s sob pressão constante de 0,07N. As leituras foram realizadas em 0,8 mm ao longo de 2,4 mm do espécime superfície do espécime (Fig. 4). Três mensurações em diferentes posições foram feitas para cada espécime e o valor médio considerado o valor de rugosidade de superfície para o referido espécime (Verran e Maryan, 1997; Moura *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2010).

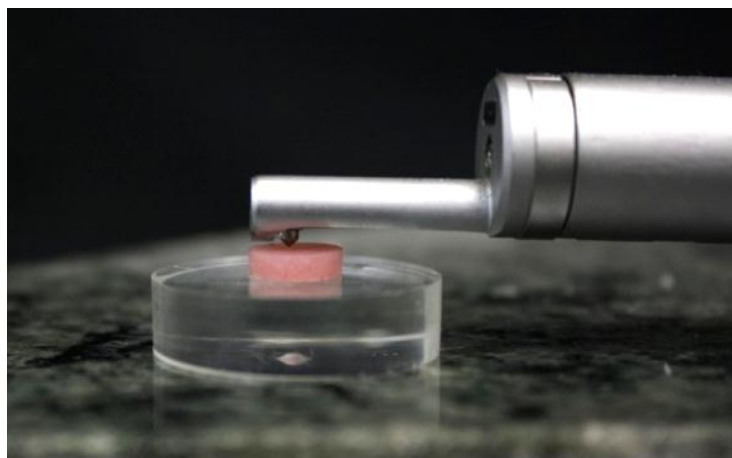


Figura 4 - Mensuração da rugosidade

Após mensuração da rugosidade, os espécimes de resina acrílica e reembasador foram descontaminados por meio de sonicação por 20 min, lavados com água destilada estéril e sonicados novamente por 20 min em ultrassom (Thornton, modelo T7, Inpec Eletrônica Ltda., São Paulo, Brasil). Em seguida, os espécimes foram utilizados para os ensaios microbiológicos de adesão e colonização.

4.4 Mensuração da Energia Livre de Superfície

Para mensuração da energia livre de superfície (erg/cm^2), os espécimes foram lavados com sabão neutro e enxaguados com água deionizada. Os espécimes ($n=12$) de PMMA e material reembasador foram submetidos a banho ultrassônico com uma solução de etanol e água dd 1:1 por 10 min, novamente submetidos a banho ultrassônico em água destilada por 10 min, e secos em temperatura ambiente. A seguir, foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: saliva, 95% de saliva acrescida de 5% de plasma e plasma. Para a formação de película, os espécimes foram colocados individualmente em poços de placas de poliestireno contendo 2 mL de uma das soluções por 60 min.

A energia livre de superfície foi determinada de acordo com Combe, (2004). O ângulo de contato formado entre a superfície do espécime e uma gota séssil (15 μ L) de um dos três líquidos utilizados (Bromonaftaleno 99%, Formamida 99,5% e água destilada) foi mensurada com auxílio do goniômetro (Ramé-Hart 500, Ramé-hart Instrument co., NJ, USA) (Fig. 5). Os líquidos foram utilizados para determinar os componentes polar e dispersivo e a energia livre total por meio do software Ramé-hart DROPimage Standard (Ramé-hart Instrument co., NJ, USA).



Figura 5 – Goniômetro.

Após mensuração da energia livre de superfície, os espécimes de resina acrílica e reembasador foram descontaminados por meio de sonicação por 20 min, lavados com água destilada estéril e sonicados novamente por 20 min. Em seguida, os espécimes destinados ao ensaio de energia livre de superfície foram divididos aleatoriamente de acordo com o tratamento de película adquirida.

4.5 Formação da película adquirida

A saliva humana total foi coletada de um voluntário saudável, sem relato de uso de antibióticos bucais ou algum medicamento que possa afetar a composição ou fluxo salivar nos últimos 3 meses (Moura *et al.*, 2006, Pereira-Cenci *et al.*, 2008). Após concordar e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética Local. O voluntário doou a saliva estimulada pela mastigação de papel parafinado Parafilm® (American Co; Greenwich, Ct, USA) que foi coletada em tubo de ensaio estéril e mantida em um recipiente com gelo até o processamento. Em seguida a saliva coletada foi clarificada pela centrifugação com 10,000g por 10 min a 4°C (Moura *et al.*, 2006; Pereira-Cenci *et al.*, 2008), o sobrenadante foi removido e filtrado. A seguir, 2 mL desta saliva clarificada foi pipetado em cada um dos poços das placas de poliestireno com 24 poços (bio-one; Greiner, Frickenhausen, Alemanha). Dentro de cada poço foi inserido um espécime e mantido por 60 min sob agitação de 75 rpm a 37°C para formação da película adquirida.

O plasma humano doado pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) foi descongelado lentamente e quando atingiu a temperatura ambiente, 2 mL deste plasma foi pipetado em cada um dos poços das placas de poliestireno com 24 poços e dentro de cada poço foi inserido um espécime que foi mantido por 60 min sob agitação de 75 rpm a 37°C para formação da película adquirida.

4.6 Preparação da Suspensão de *Candida albicans*

Cepas de *Candida albicans* ATCC 90028 foram reativadas de suas culturas originais (armazenadas em meio sólido Ágar Sabouraud, a 4°C, sob óleo mineral estéril) em 10 mL de meio de cultura Sabouraud a 37°C por um período de

incubação de 24 h em atmosfera normal. A partir das colônias obtidas, amostras foram coletadas com alça estéril e suspensas em 50 mL de meio de cultura líquido Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco Laboratories, Detroit, MI) enriquecido com 50 mM de glucose. Após 18 a 24 h de incubação a 37°C, as células foram “lavadas” duas vezes com PBS estéril. Em seguida, um novo tubo contendo YNB enriquecido com 100 mM de glucose teve sua turbidez ajustada com auxílio de um espectrofotômetro até atingir a absorvância de 0,250 com comprimento de onda igual a 520 nm. Este procedimento assegurou uma suspensão de *Candida albicans* na concentração de 10^7 cel/mL (Da Silva *et al.*, 2010).

4.7 Formação do Biofilme

Utilizando-se técnicas assépticas, cada poço de uma placa de cultura celular de 24 poços recebeu 2,0 mL de meio de cultura YNB enriquecido com 100 mM de glucose com a suspensão de 10^7 cel/mL de *C. albicans*. Os espécimes tanto do ensaio de alteração de rugosidade como de alteração de energia livre de superfície foram aleatoriamente distribuídos individualmente nesses poços. As placas contendo os espécimes foram incubadas por 90 min a 37°C a 75 rpm, para promover adesão celular (Nccls, 2002; 2004, Da Silva *et al.*, 2010). Após este período de adesão, nos grupos destinados à avaliação do biofilme na fase de adesão, foram realizadas a contagem celular, a análise da bioatividade e arquitetura do biofilme formado sobre os espécimes. Os espécimes destinados a análise do biofilme de 48 horas foram removidos dos poços, lavados com PBS e foram colocados em novos poços contendo 2,0 mL de meio de cultura YNB enriquecido com 100 mM de glucose. As placas foram novamente incubadas a 37°C a 75 rpm. Após 24 h de incubação, o meio foi aspirado e o biofilme lavado com PBS, seguido da adição de 2,0 mL do meio. Após 48 h de incubação, foi realizada a contagem celular e a análise de bioatividade e arquitetura do biofilme.

4.8 Contagem Celular

Para a contagem celular, os espécimes foram acondicionados em tubos plásticos estéreis contendo 3 mL de PBS estéril e levados ao sonificador por 30 segundos a 7 watts para desagregação do biofilme. Em seguida, o mesmo foi submetido à diluição decimal seriada e três alíquotas de 20 μ L foram inoculadas em Ágar Sabouraud e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, as colônias foram quantificadas e utilizadas para determinar o número de células presentes no biofilme (Fig. 6). Este procedimento foi realizado para o biofilme na fase de adesão e 48 h.

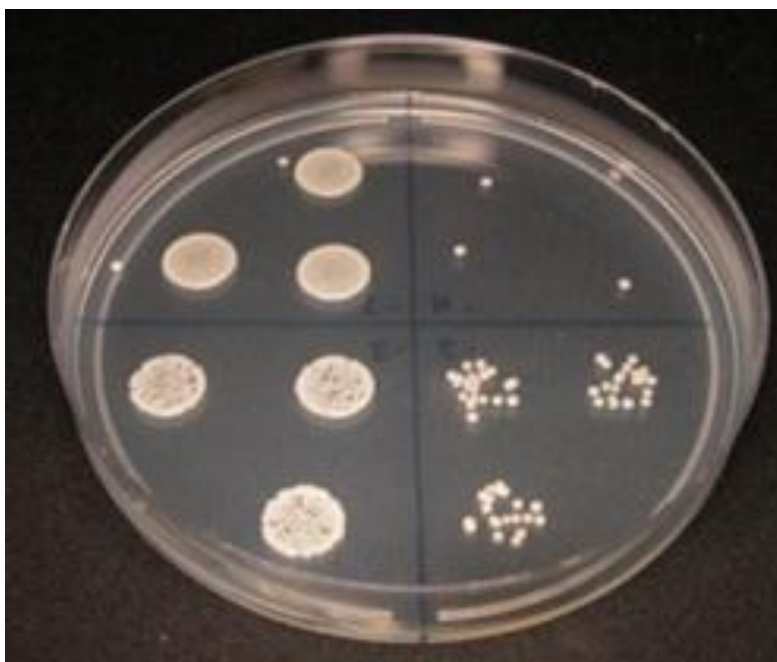


Figura 6 – Placa após semeadura e crescimento dos microrganismos para contagem celular.

4.9 Bioatividade do Biofilme

Para análise da bioatividade do biofilme, foi utilizado o teste de redução de XTT (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis., MO, USA). Os biofilmes na fase de adesão e 48 h foram lavados com PBS para remoção das células não aderidas e transferidos para novas placas de poliestireno, contendo o reagente do XTT. As placas contendo os biofilmes foram envolvidas com papel alumínio e incubadas por 3 h a 37°C. Após este período, 1 mL desta solução foi centrifugado (5 min, 6000 rpm) e o sobrenadante foi transferido para uma cubeta e levado ao espectrofotômetro (Bausch and Lomb Spectronic 20, San Pablo, CA, USA). A redução do XTT foi determinada pela absorbância registrada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

4.10 Arquitetura do Biofilme

A arquitetura do biofilme de *C. albicans* foi avaliada por meio da microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Os biofilmes formados nas superfícies dos espécimes foram tratados pelo Kit de corante Live/Dead BacLight Bacterial Viability composto pelos corantes SYTO-9 e propidium iodide (PI) (Molecular Probes, Eugene, OR) e incubados por 20 min, envolvidos com papel alumínio a 37°C antes da análise com CLSM. Imagens do biofilme corado foram obtidas nos intervalos de 1- μm na secção z para visão tridimensional do biofilme. Pelo menos cinco campos representativos de cada espécime foram examinados (Da Silva *et al*, 2010).

Para análise das imagens do CLSM foi usado o COMSTAT software. As propriedades de arquitetura do biofilme analisadas pelo COMSTAT incluíram biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura média (μm) e rugosidade média (μm) (Fig. 7 e 8).

4.11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando-se o software SAS versão 9.0 (SAS Institute, Inc, Cary, NC) com nível de significância fixado em 5%. As suposições da igualdade de variâncias e normalidade da distribuição dos erros foram avaliadas para cada variável e os dados foram transformados quando os critérios não foram obtidos: log₁₀ (bio-volume, contagem celular e espessura média). Análise de variância a dois critérios foi usada para comparar as propriedades de superfície e o período de desenvolvimento do biofilme considerando os dados de células viáveis *C. albicans*, a bioatividade e arquitetura do biofilme. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey HSD.

5 RESULTADOS

Os valores médios e os desvios padrão para o fator em estudo de rugosidade de superfície e as variáveis respostas (contagem celular, bioatividade, bio-volume, espessura média, e rugosidade média) estão apresentados nas tabelas 1 e 2 para a resina de PMMA e nas tabelas 3 e 4 para o reembasador.

Tabela 1 – Rugosidade de superfície, contagem celular ($\times 10^6$ cel/mm²) e bioatividade (D.O. de XTT) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de PMMA adesão e 48 horas (média \pm d.p; n=12).

Rugosidade de Superfície	Contagem celular		Bioatividade	
	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas
0,30 μ m	1,90 \pm 0,3 A,a	52,7 \pm 9,2 B,a	2,04 \pm 0,32 A,a	3,52 \pm 0,20 B,a
0,11 μ m	2,09 \pm 0,4 A,a	37,8 \pm 10,5 B,b	1,98 \pm 0,25 A,a	3,27 \pm 0,37 B,a
0,12 μ m	1,86 \pm 0,2 A,a	40,0 \pm 8,2 B,a	2,04 \pm 0,32 A,a	3,01 \pm 0,33 B,a
0,17 μ m	2,16 \pm 0,3 A,a	50,5 \pm 6,8 B,a	2,11 \pm 0,36 A,a	3,21 \pm 0,35 B,a

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os períodos avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a rugosidade de superfície dentro dos períodos avaliados. (Tukey HSD, $p < 0,001$).

De acordo com os dados da tabela 1 pode ser observado que as diferentes rugosidades de superfície não influenciaram a contagem celular ou a bioatividade para ambos os tempos avaliados ($p > 0,05$). Diferenças significantes foram observadas apenas entre os tempos de formação do biofilme: adesão ou 48

h o que era esperado, pois à medida que a colonização ocorre o número de células aumenta ($p < 0,001$).

Tabela 2 - Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura (μm) e rugosidade (μm) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de PMMA nos tempos avaliados (média \pm d.p; n=5).

Rugosidade de Superfície	Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)		Espessura (μm)		Rugosidade (μm)	
	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas
0,30 μm	5,09 \pm 1,42 A,a	8,37 \pm 0,45 B,a	4,56 \pm 1,38 A,a	11,08 \pm 1,69 B,a	0,3 \pm 0,28 A,a	0,48 \pm 0,09 B,a
0,11 μm	1,24 \pm 0,28 A,b	6,36 \pm 2,2 B,a	2,56 \pm 0,81 A,b	8,53 \pm 1,92 B,a	1,03 \pm 0,29 A,b	0,27 \pm 0,20 B,a
0,12 μm	2,23 \pm 0,67 A,ab	8,56 \pm 2,31 B,a	4,20 \pm 1,32 A,ab	10,81 \pm 2,07 B, a	0,3 \pm 0,35 A,a	0,14 \pm 0,22 B,a
0,17 μm	4,33 \pm 1,92 A,ab	4,8 \pm 0,61 B,a	3,36 \pm 1,45 A,ab	6,28 \pm 0,61 B,a	0,97 \pm 0,41 A,b	0,69 \pm 0,11 B,a

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os períodos avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a rugosidade de superfície dentro dos períodos avaliados. (Tukey HSD, $p < 0,001$).

Na tabela 2, também foi observado diferenças significantes ($p < 0,001$) entre os tempos de formação do biofilme para as variáveis bio-volume, espessura e rugosidade.

Diferenças significantes foram encontradas para as variáveis de bio-volume, espessura e rugosidade do biofilme na fase de adesão entre a maior (0,30 μm) e a menor (0,11 μm) rugosidade de superfície. Entretanto, quando o biofilme atingiu 48 h de maturação essas diferenças deixaram de existir.

Tabela 3 - Contagem celular ($\times 10^6$ cel/mm²) e bioatividade (D.O. de XTT) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de reembasador nos períodos avaliados (média \pm d.p; n=12).

Rugosidade de Superfície	Contagem celular		Bioatividade	
	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas
0,31 μ m	2,08 \pm 0,6 A,a	45,1 \pm 16,6 B,a	2,19 \pm 0,31 A,a	3,48 \pm 0,29 B,a
0,13 μ m	2,05 \pm 0,3 A,a	47,9 \pm 14,8 B,a	2,19 \pm 0,29 A,a	3,05 \pm 0,45 B,a

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os períodos avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a rugosidade de superfície dentro dos períodos avaliados. (Tukey HSD, $p < 0,001$).

Tabela 4 - Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura média (μm) e rugosidade de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de reembasador (média \pm d.p; n=5).

Rugosidade de Superfície	Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)		Espessura (μm)		Rugosidade (μm)	
	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas
0,31 μ m	1,31 \pm 0,46 A,a	3,48 \pm 1,16 B,a	1,03 \pm 0,21 A,a	5,47 \pm 1,67 B,a	1,37 \pm 0,25 A,a	0,63 \pm 0,40 B,a
0,13 μ m	1,94 \pm 0,70 A,a	3,62 \pm 1,67 B,a	4,11 \pm 1,10 A,a	5,67 \pm 1,43 B,a	0,07 \pm 0,04 A,b	0,67 \pm 0,47 B,a

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os períodos avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre a rugosidade de superfície dentro dos períodos avaliados. (Tukey HSD, $p < 0,001$).

Na análise das tabelas 3 e 4 observa-se que a rugosidade de superfície do reembasador não interferiu no número de células, na bioatividade, no bio-volume e na espessura do biofilme de *Candida albicans* ATCC 90028 ($p < 0,05$). As diferenças observadas foram apenas para os tempos avaliados ($p < 0,001$).

Entretanto, para a rugosidade do biofilme houve diferença para a fase adesão quando foi observado que a menor rugosidade do reembasador (0,13 μm) apresentou também a menor rugosidade do biofilme ($p < 0,001$) quando comparado à maior rugosidade do substrato (0,31 μm).

As tabelas de 5 a 10 apresentam as médias e desvios-padrão, assim como os resultados da análise estatística para a energia livre de superfície.

Tabela 5. Energia livre de superfície do PMMA (componente polar, componentes polar positivo e negativo, componente dispersivo e energia livre total) conforme os tratamentos (média \pm desvio padrão; $n=12$).

Tratamento	γ_s^P	γ_s^{P+}	γ_s^{P-}	γ_s^D	γ_s
Saliva	8,70 \pm 2,10 a	2,40 \pm 0,17 a	36,70 \pm 8,23 a	31,77 \pm 1,59 a	50,43 \pm 0,84 a
Plasma	9,87 \pm 3,61 b	2,27 \pm 1,71 a	17,43 \pm 12,48a	32,87 \pm 3,36 a	42,73 \pm 6,79 a
Saliva/Plasma	20,10 \pm 1,84 a	2,55 \pm 0,21 a	40,70 \pm 11,31a	30,55 \pm 1,34 a	50,65 \pm 0,49 a

Letras distintas indicam diferenças estatísticas significantes (Tukey HSD, $p < 0,001$).

De acordo com o apresentado na tabela 5, os tratamentos de superfície da resina de PMMA, não apresentaram diferenças significantes para a energia livre total que é a de interesse no estudo ($p > 0,05$).

Na tabela 6 estão apresentados a contagem celular e a bioatividade do biofilme de *Candida* formado sobre a resina de PMMA. Observam-se diferenças entre os tempos de adesão e 48 h para todos os tratamentos ($p < 0,001$). Entretanto dentro do mesmo período, adesão ou 48 horas foram observadas diferenças significantes para o tratamento com saliva na contagem celular onde foi encontrado o menor número de células aderidas.

Apesar de haver diferenças entre o número de células quando a superfície foi tratada com saliva não houve diferenças para a bioatividade ($p > 0,05$).

Tabela 6. Contagem celular ($\times 10^6$ cel/mm²) e bioatividade (D.O. de XTT) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de PMMA de acordo com os tratamentos e tempos (média \pm d.p; n=12).

Tratamento	Contagem celular		Bioatividade	
	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas
Saliva	1,90 \pm 0,3 A,a	48,8 \pm 14,0 B,a	2,04 \pm 0,32 A,a	3,52 \pm 0,20 B,a
Plasma	2,87 \pm 0,8 A,b	73,8 \pm 18,0 B,b	2,31 \pm 0,34 A,a	3,47 \pm 0,21 B,a
Saliva/Plasma	2,91 \pm 0,8 A,b	94,6 \pm 9,2 B,b	2,44 \pm 0,38 A,a	3,50 \pm 0,24 B,a

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os períodos avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos de superfícies dentro dos períodos avaliados. (Tukey HSD, $p < 0,001$).

Na tabela 7, para a resina de PMMA, o bio-volume, a espessura e rugosidade do biofilme foram influenciados pelos tratamentos de superfície. Observou-se que o bio-volume apresentou maior valor para o tratamento com saliva+plasma, seguido pela saliva e plasma na fase de adesão. Entretanto, para o biofilme maduro de 48 h o maior bio-volume foi observado para o plasma e o menor para a saliva.

A espessura e a rugosidade do biofilme foram afetadas pelos tratamentos de superfície da resina, sendo que os maiores valores de espessura foram observados para adesão e 48 h quando o substrato foi tratado com saliva/plasma e apenas plasma, respectivamente ($p < 0,001$). No caso da rugosidade chama a atenção que o biofilme crescido na presença de saliva/plasma apresentou-se liso na fase de adesão e, rugoso quando formado na presença apenas de saliva.

Tabela 7. Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura (μm) e rugosidade (μm) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de PMMA de acordo com os tratamentos e tempos (média \pm d.p; n=5).

Tratamento	Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)		Espessura (μm)		Rugosidade (μm)	
	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas
Saliva	5,09 \pm 1,42 A,a	8,37 \pm 0,45 B,a	4,56 \pm 1,38 A,a	11,29 \pm 1,64 B,a	0,30 \pm 0,28 A,a	0,43 \pm 0,16 B,a
Plasma	4,37 \pm 0,90 A,a	15,10 \pm 0,40 B,b	6,34 \pm 1,45 A,b	14,58 \pm 0,11 B,b	0,69 \pm 0,28 A,b	0,04 \pm 0,01 B,b
Saliva /Plasma	12,83 \pm 2,04 A,b	10,85 \pm 1,73 B,c	11,83 \pm 2,04 A,c	10,63 \pm 0,56 B,c	0,00 \pm 0,00 A,c	0,06 \pm 0,08 B,b

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os períodos avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos de superfícies dos períodos avaliados. (Tukey HSD, $p < 0,001$).

Na tabela 8 estão apresentados os valores médios e desvios-padrão da energia livre de superfície do reembasador após tratamentos com saliva, plasma ou saliva/plasma. Destaca-se que o tratamento de superfície com plasma diferiu significativamente dos outros dois tratamentos, mostrando menor energia livre de superfície ($p < 0,001$).

Tabela 8. Energia livre de superfície de Reembasador (componente polar, componentes polar positivo e negativo, componente dispersivo e energia livre total) conforme os tratamentos (média \pm desvio padrão; n=12).

Tratamento	γ_s^P	γ_s^{P+}	γ_s^{P-}	γ_s^D	γ_s
Saliva	15,00 \pm 2,74 a	1,19 \pm 0,45 a	48,97 \pm 2,65 a	31,60 \pm 0,44 a	46,37 \pm 3,01 a
Plasma	6,47 \pm 1,46 b	0,55 \pm 0,32 a	21,60 \pm 8,57 a	31,83 \pm 2,20 a	38,30 \pm 1,78 b
Saliva/Plasma	18,90 \pm 5,31 ab	2,76 \pm 1,54 a	38,87 \pm 16,88 a	30,37 \pm 1,63 a	49,30 \pm 4,05 a

Letras distintas indicam diferenças estatísticas significantes (Tukey HSD, $p < 0,001$).

A tabela 9 apresenta os valores médios e desvios-padrão da contagem celular e bioatividade de *Candida albicans* ATCC 90028 na fase de adesão e após 48 h de formação do biofilme sobre as películas de saliva, plasma ou saliva/plasma formadas sobre o reembasador. Observam-se diferenças significantes na contagem celular para a fase de adesão quando a película de saliva apresentou a menor contagem celular comparado às outras duas películas. Entretanto, para o biofilme de 48 h, a maior contagem foi observada para a película de saliva/plasma, diferindo das outras duas películas ($p < 0,001$). A variável resposta bioatividade não foi afetada pelas películas.

Tabela 9. Contagem celular (10^6 cel/mm²) e bioatividade (D.O. de XTT) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de reembasador de acordo com os tratamentos e tempos (média \pm d.p; n=12).

Tratamento	Contagem celular		Bioatividade	
	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas
Saliva	1,97 \pm 0,5 A,a	45,1 \pm 16,6 B,a	2,23 \pm 0,31 A,a	3,48 \pm 0,29 B,a
Plasma	2,71 \pm 0,6 A,b	54,4 \pm 8,54 B,a	2,22 \pm 0,32 A,a	3,51 \pm 0,28 B,a
Saliva/Plasma	2,79 \pm 0,8 A,b	88,3 \pm 13,0 B,b	2,40 \pm 0,33 A,a	3,60 \pm 0,16 B,a

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os períodos avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos de superfícies dos períodos avaliados. (Tukey HSD, $p < 0,001$).

Os dados de bio-volume, espessura e rugosidade do biofilme de *Candida albicans* ATCC 90028 estão apresentados na tabela 10. De acordo com esses resultados verifica-se que o bio-volume e a espessura foram influenciados pelas películas formadas sobre o reembasador, mostrando diferenças significantes entre as três películas tanto para adesão quanto para o biofilme de 48 h.

Entretanto para a rugosidade de superfície apenas na fase de adesão as películas influenciaram ($p < 0,001$), sendo que a maior rugosidade foi observada para a película de saliva, sendo quase três vezes maior do que a do biofilme formado sobre saliva/plasma.

Tabela 10. Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura (μm) e rugosidade (μm) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de reembasador de acordo com os tratamentos e tempos (média \pm d.p; n=5).

Tratamento	Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)		Espessura (μm)		Rugosidade (μm)	
	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas	Adesão	48 horas
Saliva	1,31 \pm 0,46 A,a	3,48 \pm 1,16 B,a	3,76 \pm 1,31 A,a	5,47 \pm 1,67 B,a	1,37 \pm 0,25 A,a	0,43 \pm 0,16 B,a
Plasma	7,11 \pm 0,61 A,b	5,77 \pm 2,11 B,b	7,53 \pm 0,34 A,b	9,70 \pm 2,11 B,b	0,07 \pm 0,04 A,b	0,32 \pm 0,32 B,a
Saliva /Plasma	3,89 \pm 1,70 A,c	11,65 \pm 2,69 B,c	4,48 \pm 1,30 A,c	4,89 \pm 2,15 B,c	0,47 \pm 0,34 A,c	0,32 \pm 0,32 B,a

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os períodos avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos de superfícies dos períodos avaliados. (Tukey HSD, $p < 0,001$).

As figuras 7 e 8 mostram imagens tridimensionais obtidas no CLSM representativa de biofilmes de *Candida albicans* ATCC 90028 no período de adesão e 48 h para resina PMMA e reembasador, respectivamente. As células vivas são mostradas em verde e as células mortas em vermelho. Na fase inicial de adesão é observado menor número de células com grande espaçamento entre as mesmas. No biofilme de 48 h observa-se um biofilme desenvolvido com várias camadas celulares e a presença de canais de difusão.

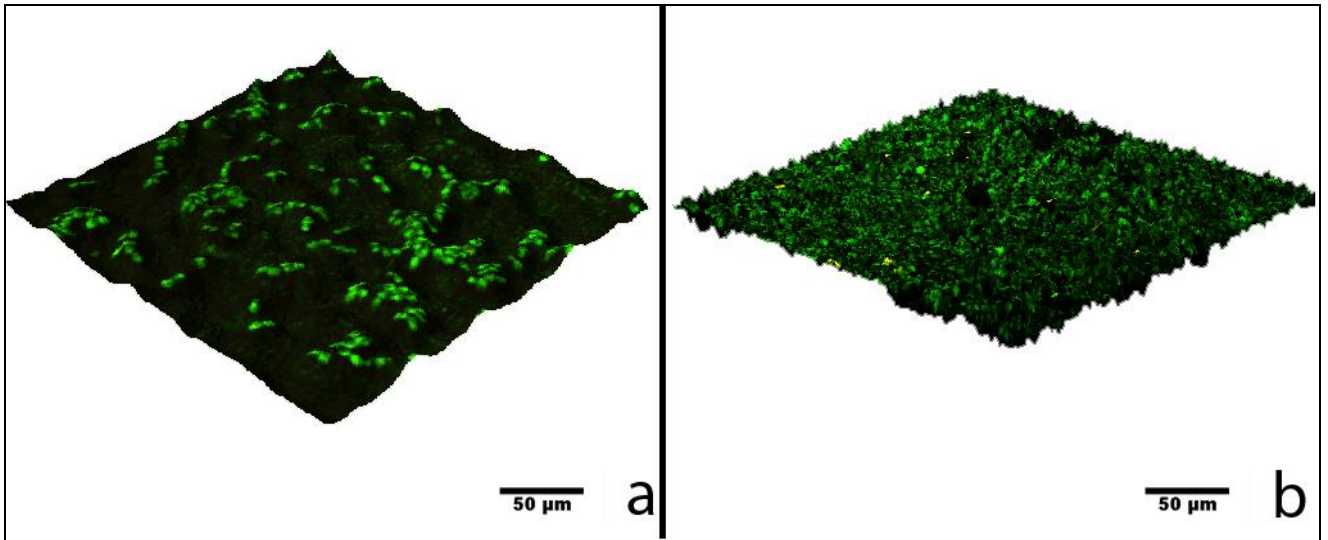


Figura 7 – CLSM imagem em 3D representativa de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 (a - adesão; b – 48 horas) desenvolvidos sobre a superfície de resina a base de PMMA.

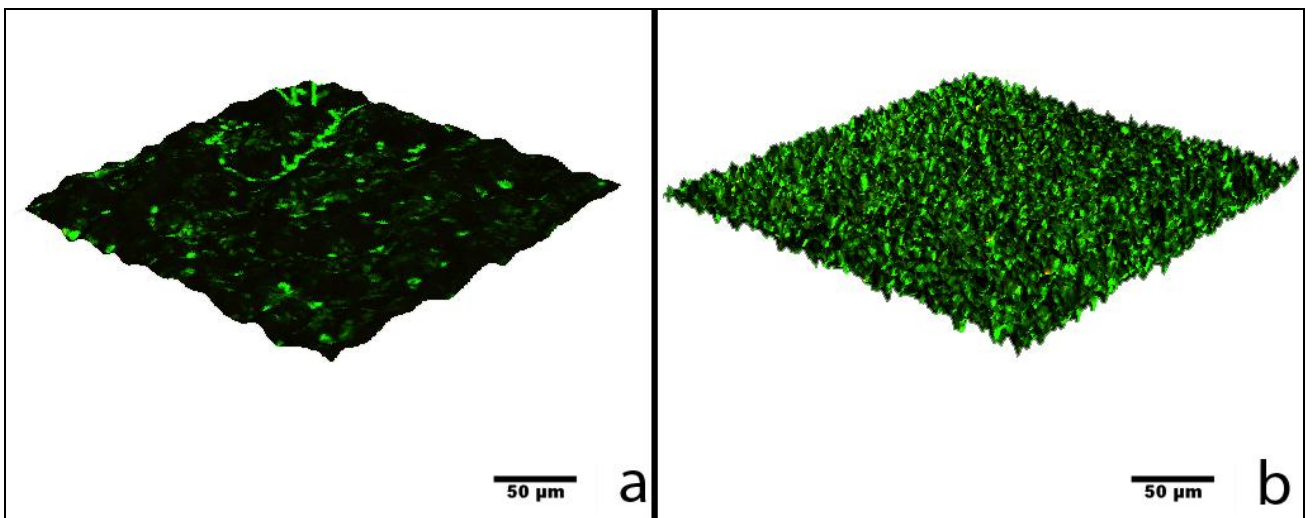


Figura 8 – CLSM imagem em 3D representativa de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 (a - adesão; b – 48 horas) desenvolvidos sobre a superfície do material reembasador.

6 DISCUSSÃO

Considerando a alta incidência de estomatite protética em portadores de prótese dental removível e no intuito de assegurar a relevância clínica, o ensaio de aderência e desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans* realizado neste estudo foi executado em materiais rotineiramente utilizados em procedimentos protéticos. A rugosidade de superfície da resina de PMMA é de grande relevância clínica pois pode facilitar a adesão do biofilme e provocar manchamento superficial pelo acúmulo de detritos alimentares (Quiryneen *et al.*, 1990; Bollen *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1998; Zissis *et al.*, 2000). Uma superfície é considerada rugosa quando apresenta protuberâncias e reentrâncias, com grande amplitude e curto comprimento de onda. A rugosidade de superfície pode ser expressa numericamente por diversos parâmetros sendo o mais comumente utilizado a rugosidade média (Ra), obtida pela média aritmética entre os picos e vales percorridos pela ponta ativa do rugosímetro (Leitão & Hegdahl, 1981).

A influência da rugosidade de superfície na adesão, colonização e desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans* levou ao estudo da contagem celular, bioatividade e morfologia deste biofilme na fase de adesão e após 48 horas de maturação. Diferenças significativas foram observadas, nos parâmetros citados, entre os períodos de formação do biofilme: adesão e após 48 horas. Estas diferenças eram esperadas, pois à medida que a colonização ocorre e o biofilme se desenvolve, aumentam o número de células, bioatividade, bio-volume, espessura média e rugosidade média. Este trabalho não objetivou comparar os dois materiais utilizados, resina acrílica PMMA e reembasador rígido.

Para a maioria dos autores, as superfícies com maior rugosidade apresentam tendência a aumentar a aderência de *Candida* (Yamauchi *et al.*, 1990; Radford *et al.*, 1998; Neyzatoglu *et al.*, 2007; Pereira-Cenci *et al.*, 2007). No entanto, as alterações de rugosidade de superfície avaliadas neste estudo (0,30 μm , 0,17 μm , 0,12 μm e 0,11 μm) não provocaram diferenças significativas na

contagem celular, no período de adesão, do biofilme formado sobre as superfícies dos espécimes de PMMA, conforme tabela 1. Isto provavelmente se justifica pela pequena variação de rugosidade entre os grupos, apesar de haver diferenças estatisticamente significativas entre os valores da rugosidade. A bioatividade do biofilme, nos dois períodos avaliados, também não sofreu diferença significativa com a alteração da rugosidade. Porém, no período de adesão, houve diferença significativa no bio-volume, espessura média e rugosidade do biofilme formado sobre PMMA, ficando o grupo de maior rugosidade ($R_a = 0,30 \mu\text{m}$) o que obteve biofilme com maior bio-volume e espessura e o grupo de menor rugosidade ($R_a = 0,11 \mu\text{m}$) o que obteve biofilme com menor bio-volume e espessura. Estes resultados confirmam que na fase inicial de adesão, as irregularidades das superfícies de maior rugosidade promovem retenção e proteção das células aderidas (Taylor *et al.*, 1998; Pereira-Cenci *et al.*, 2008) permitindo um biofilme com maior bio-volume e espessura.

O bio-volume representa o volume total do biofilme e também proporciona uma estimativa de sua biomassa podendo ser definido como o volume da biomassa dividido pela área do substrato. A espessura do biofilme fornece uma medida do tamanho espacial do biofilme. A espessura média pode proporcionar informação sobre a extensão superior do biofilme. A rugosidade do biofilme representa a medida de quanto varia a espessura do biofilme e é um indicador da heterogeneidade.

A rugosidade do biofilme está relacionada com a maneira como as células estão dispostas no biofilme e não com o número de células, bio-volume ou espessura. Isto justifica na tabela 2 o biofilme formado sobre o grupo de menor rugosidade ($R_a = 0,11 \mu\text{m}$) ter apresentado, na fase de adesão, menor bio-volume e espessura e maior rugosidade. Este biofilme após 48 h apresentou rugosidade menor que na fase de adesão, provavelmente houve uma aglutinação das células e compactação do biofilme.

Quanto à análise do biofilme de 48 horas desenvolvido sobre a superfície de PMMA, foi constatado que apesar da alteração na rugosidade de superfície dos espécimes, não houve alteração significativa na bioatividade, bio-volume, espessura média e rugosidade média dos biofilmes formados. Isto sugere que após adesão e colonização, a alteração da rugosidade de superfície não mais interfere no desenvolvimento e arquitetura do biofilme conforme Da Silva *et al.* 2010.

A alteração da rugosidade de superfície avaliada no reembasador, tabelas 3 e 4, não provocou diferença significativa na contagem celular, bioatividade, bio-volume e espessura média nem na fase de adesão, nem no biofilme maduro de 48 horas. As diferenças observadas foram apenas para os tempos avaliados.

Na cavidade oral, a adesão inicial de *Candida albicans* sobre a resina de PMMA é precedida pela formação da película adquirida que consiste primariamente de compostos orgânicos proteicos secretados fisiologicamente pelas glândulas salivares (Radford *et al.*, 1999; Moura *et al.*, 2006). A manifestação clínica da estomatite protética apresenta uma mucosa edemaciada com injúrias do epitélio oral que pode ocasionar micro-hemorragias e conseqüentemente presença de proteínas plasmáticas que também podem se depositar sobre a resina de PMMA formando uma película adquirida. A formação de películas sobre a superfície da prótese está diretamente relacionada à sua capacidade de molhamento que é regulada pela energia livre de superfície por meio de interações ácido-base aonde o componente ácido do líquido (Y_l^+) na interface interage com o componente base do sólido (Y_s^-) e o componente básico do líquido (Y_l^-) interage com o componente ácido do sólido (Y_s^+) (Sipahi *et al.*, 2001).

Estudos demonstram que a energia livre de superfície tem um importante papel nas fases iniciais de adesão da *Candida albicans* sendo que os substratos com níveis elevados de energia livre de superfície induzem a uma maior adesão (Minagi *et al.*, 1985). Neste estudo, a energia livre de superfície foi

mensurada após a imersão dos espécimes em saliva, plasma e 95% de saliva + 5% plasma durante 90 min para formação da película adquirida. Assim, conforme tabela 5, os tratamentos de superfície de resina PMMA, não apresentaram diferença significativa na energia livre total.

Neste estudo, houve diferença significativa quando se analisou a contagem celular, bio-volume, espessura média e rugosidade média do biofilme de *Candida albicans*, nos períodos de adesão e 48 horas, formado sobre as diferentes películas dos espécimes da resina de PMMA e material reembasador. Isto provavelmente se deve a presença de proteínas nas películas conforme relatou Radford *et al.* (1999) e Moura *et al.* (2006).

Os resultados da tabela 6 e 9 mostram que houve diferença significativa na contagem celular para o tratamento com saliva onde foi encontrado o menor número de células aderidas, nos períodos de adesão e 48 horas. A presença de saliva provocando redução no número de células aderidas à resina acrílica, está de acordo com os trabalhos de Radford *et al.* (1999); Nikawa *et al.* (2000); Moura *et al.* (2006) e Pereira-Cenci *et al.* (2007), no entanto, diverge do estudo de Ramage *et al.* (2004) que relataram um aumento no número de células aderidas a superfície da resina acrílica com a película de saliva. Jin *et al.* (2004) publicaram que a película de saliva não promoveu nenhum efeito no processo de adesão inicial do biofilme de *Candida albicans* sobre a resina acrílica. Uma das razões para explicar estes resultados divergentes é a diferença de saliva utilizada: estimulada ou não estimulada, o que resulta em saliva com diferente viscosidade e composição proteica. Outros fatores que podem está relacionados aos diferentes resultados dos estudos é a utilização de saliva total ou filtrada assim como diferentes períodos de incubação (Pereira-Cenci *et al.*, 2008).

Nikawa *et al.* (2000) após usarem películas de saliva, plasma e saliva+plasma sobre resina acrílica e incubar com *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* concluíram que quanto maior a concentração de plasma na película maior a bioatividade do biofilme de *Candida*. Neste estudo não houve diferença

significativa na contagem celular e bioatividade para o tratamento de plasma/saliva e plasma, nos períodos de adesão e 48 horas (tabela 6), ficando os maiores valores para o tratamento com saliva/plasma. Isto pode ter ocorrido em virtude deste estudo ter utilizado o teste de redução de XTT para mensuração da bioatividade enquanto o estudo de Nikawa utilizou o ensaio de bioluminescência da adenosina trifosfato (ATP).

A película de saliva sobre o reembasador rígido promoveu biofilmes com menores bio-volume e espessura nos dois períodos avaliados conforme tabela 10. No entanto, promoveu a maior rugosidade na fase de adesão que foi reduzida no biofilme desenvolvido de 48 h. Isto provavelmente é justificado porque a propriedade de rugosidade do biofilme está relacionada com a maneira como as células estão dispostas no biofilme. Assim, a redução da rugosidade do biofilme após 48 h pode ter ocorrido devido à aglutinação das células e compactação do biofilme.

Os resultados mostraram que a presença de proteínas salivares e plasmáticas presentes na cavidade oral estão fortemente relacionadas com a adesão e estrutura do biofilme. Novos estudos são necessários para esclarecer por que a saliva e o plasma interferem na adesão, desenvolvimento e estrutura do biofilme de *Candida albicans* sobre resina acrílica a base de PMMA e que influência teriam estas películas sobre outras espécies de *Candida*.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e considerando as limitações deste trabalho, é possível concluir que:

- A alteração da rugosidade de superfície afetou a estrutura do biofilme de *Candida albicans* na fase de adesão, no entanto, não afetou a estrutura do biofilme desenvolvido de 48 horas.
- A alteração da energia livre de superfície por meio da deposição de proteínas salivares e/ou plasmáticas alterou a estrutura do biofilme de *Candida albicans* nas fases de adesão e 48 horas.

REFERÊNCIAS¹

1. Anusavice KJ. Materiais dentários de Philips. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 412p.
2. Berger JC, Driscoll CF, Romberg E, Luo Q, Thompson G. Surface roughness of denture base acrylic resins after processing and after polishing. J Prosthodont. 2006;15(3): 180-6.
3. 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;13(4): 258-69.
4. Busscher H, Pelt AV, Jong HD, Arends J. Effect of spreading pressure on surface free energy determinations by means of contact angle measurements. J Colloid Interface Sci. 1983; 95(1): 23-7.
5. Busscher H, Pelt AV, Jong HD, Arends J. Effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. Colloids Surf. 1984; 9: 319-31.
6. Combe EC, Owen BA, Hodges JS. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. Dent Mater. 2004; 20(3): 262-8.
7. Da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EAR, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. Braz Dent J. 2008; 19(4): 364-9.
8. Da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010; 94B: 149-56.

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

9. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Burgers R. In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20: 249-55.
10. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol*. 2004; 49(10): 789-98.
11. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a Major Human Fungal Pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49(2): 171-7
12. Leitão J, Hegdahl T. On the measuring of roughness. *Acta Odontol Scand*. 1981; 36(9): 379-83.
13. 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; 47: 1-14.
14. Monsenego P, Baszkin A, Costa ML, Lejoyeux J. Complete denture retention. Part II: wettability studies on various acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent*. 1989; 62(3): 308-12.
15. Moura JS, Da Silva WJ, Pereira T, Del Bel Cury AA, Rodrigues Garcia RC. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent*. 2006; 96: 205-11.
16. Nevzatoglu EU, Ozcan M, Kulak-Ozkan Y, Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin Oral Invest*. 2007; 11: 231-6.
1. Nccls. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). 2002.
17. Nccls. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline – NCCLS document M44-A (ISBN 1-56238-532-1). 2004.

18. Nikawa H, Nishimura H, Makihira S, Hamada T, Sadamori S, Samaranayake LP. Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses*. 2000; 43: 139-43.
19. Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007; 20: 308-10.
20. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, *et al*. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008; 53: 755-64.
21. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil*. 2002; 29(11): 1115-9.
22. 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; 17(3): 138-44.
23. Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface free energy on supra and subgingival plaque formation in man, a review of the literature. *J Clin Periodontol*. 1995; 22(1): 1-14.
24. Radford DR, Timothy FW, Walter JD, Challacombe SJ. The effects of surface machining on heat cured acrylic resin and two soft denture base materials: a scanning electron microscope and confocal microscope evaluation. *J Prosthet Dent*. 1997; 77: 200-8.
25. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent*. 1998; 26: 577-83.

26. 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.
27. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 98: 53-9.
28. Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Higsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. Int J Prosthodont. 2005; 18: 392-8.
29. Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. J Dent. 2001; 29: 197-204.
30. Taylor R, Maryan C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. J Prosthet Dent. 1998; 80(5): 592-7.
31. ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009; 88: 105-15.
32. Tsang CS, Ng H, McMillan AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. Clin Oral Invest. 2007; 11: 361-8.
33. Ulusoy M, Ulusoy N, Aydin AK. An evaluation of polishing techniques on surface roughness of acrylic resins. J Prosthet Dent. 1986; 56(1): 107-12.
34. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. J Prosthet Dent. 1997; 77(5): 535-9.
35. Van Der Valk P, Van Pelt AW, Busscher HJ, De Jong HP, Wildevuur CR, Arends J. Interaction of fibroblast and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading. J Biomed Mater Res. 1983; 17(5): 807-17.

36. Yamauchi M, Yamamoto K, Wakabayashi M, Kawano J. *In vitro* adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture. *Dent Mat J.* 1990; 9 (1): 19-24.
37. Zisis AJ, Polysois GL, Yannikakis, Harrison A. Roughness of denture materials. *Int J Prosthodont.* 2000; 13(2): 136-40.

ANEXO



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Influência da rugosidade de superfície e energia livre de superfície da resina a base de poli (metilmetacrilato) no desenvolvimento e estrutura do biofilme de Candida albicans**", protocolo nº 065/2009, dos pesquisadores Célia Marisa Rizzatti Barbosa, Altair Antoninha Del Bel Cury, Cristiane Maria Brasil Leal e Wander José da Silva, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 17/06/2009.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Influence of the poly (methylmethacrylate) surface roughness and surface free energy on the development and structure of the Candida albicans biofilm**", register number 065/2009, of Célia Marisa Rizzatti Barbosa, Altair Antoninha Del Bel Cury, Cristiane Maria Brasil Leal and Wander José da Silva, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador