UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DENISE GUSMÃO DE OLIVEIRA

Estudo *in vitro* da formação do biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica termopolimerizável revestida por nanopartículas de dióxido de silício (revestimento cerâmico)

BAURU
2013

DENISE GUSMÃO DE OLIVEIRA

Estudo *in vitro* da formação do biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica termopolimerizável revestida por nanopartículas de dióxido de silício (revestimento cerâmico)

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

BAURU

2013

Oliveira, Denise Gusmão de

Ol4e Estudo *in vitro* da formação do biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica termopolimerizável revestida por nanopartículas de dióxido de silício (revestimento cerâmico)/ Denise Gusmão de Oliveira. – Bauru, 2013.

97 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

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

Assinatura:

Data:

DADOS CURRICULARES

DENISE GUSMÃO DE OLIVEIRA

15/06/1986	Nascimento Manaus-Amazonas-Brasil
2004-2009	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
2009-2010	Especialização em Prótese Dentária pela Associação de Cirurgiões Dentistas- Bauru
2010-2011	Aperfeiçoamento em Prótese sobre Implante pela Clínica Via Oral
2011-2012	Aperfeiçoamento em Implantodontia pelo Instituto de Ensino Odontológico (IEO)
2011-2013	Pós-graduação em nível de Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de concentração em Reabilitação Oral Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB Universidade de São Paulo - USP

“Trancar o dedo numa porta dói. Bater com o queixo no chão dói. Torcer o tornozelo dói. Um tapa, um soco, um pontapé, doem. Dói bater a cabeça na quina da mesa, dói morder a língua, dói cólica, cárie e pedra no rim. Mas o que mais dói é saudade.”

Martha Medeiros

“Quem inventou a distância nunca sofreu a dor de uma saudade”

Autor Desconhecido

Dedicatória

Aos meus pais, Omara Oliveira de Gusmão e Ozenir Gomes de Oliveira.

Mãe, não consigo expressar como me sinto abençoada por te ter em minha vida. És exemplo vivo de mãe amorosa e mulher guerreira. Me acalma apenas com o tom de voz. És minha fortaleza. Me dá a segurança e tranquilidade para tomar minhas decisões, por mais difíceis que elas sejam. Respeita as minhas decisões como mulher, mas cuida de mim ainda como uma menina. Obrigada, mãe, por todo o apoio, por todo o carinho e por todo o amor que me guiaram até aqui. E por tudo isso, a ti dedico não só este trabalho, mas minha vida inteira!

Pai, tu és um ser humano muito sensível, observador e cuidadoso. E de ti acho que herdei mais do que a cor dos olhos. Nossas incessantes conversas, discussões e questionamentos acerca da vida despertaram em mim o senso crítico indispensável a uma pesquisadora. Me encanto, a todo pequeno passo dado, ao perceber em teus olhos o orgulho que sentes de mim. Pretendo continuar te proporcionando este sentimento até onde Deus me permitir. Paizão, obrigada pelo amor incondicional e sempre presente. Tu és minha paz de espírito e por isso a ti dedico este trabalho e toda a minha vida!

Dedicatória

Aos meus irmãos, Daniella Gusmão de Oliveira e Sergio Augusto de Stefano

Dan, só em pensar em te escrever alguma dedicatória ou agradecimento meus olhos se enchem de lágrimas e meu peito infla de um misto de amor, saudade, gratidão e orgulho. Já tive tantos brilhantes mestres na vida, mas as lições que aprendemos juntas são as que fazem de mim o que sou hoje. Gostaria de poder estar sempre por perto para cuidar de ti como sempre fiz, mas tive de me ausentar e acabei me surpreendendo com tua habilidade e força ao enfrentar as adversidades. E transbordando em orgulho, percebi a mulher maravilhosa que te tornaste. Dan, esse nosso elo transcende muitas vidas. E, a ti dedico este trabalho por simplesmente não saber quem eu seria sem você. Te amo!

Serginho, em plenos anos da minha adolescência você veio nos trazer alegria e me fazer querer voltar sempre mais cedo para casa. Você é um presente de Deus e eu não poderia escolher um irmão melhor ou mais legal. Desculpa, meu amor, pelos anos de ausência e pelas lágrimas derramadas ao me ver partir. Se eu pudesse tomara toda a sua dor e faria a minha. Mas apesar da distância, posso ver que tu te tornaste um menino maravilhoso que me orgulha demais pela sua paixão pela leitura, habilidade no tênis de mesa, empenho nos estudos, mas me orgulha principalmente por ser quem tu és. A mana te ama muito! A ti, meu príncipe, dedico este trabalho.

Agradecimentos

A **Deus**, pela minha família, pela minha saúde, pela minha vida e por todo o amor que me cerca. Dedico a Ti esta vitória!

A meus **tios, tias, primos e primas**, pela nossa união, pelo nosso amor e pela constante torcida pela minha vitória. Temos uma família linda que nos momentos de dificuldade mostra sua força e por tudo isso lhes sou muito grata!

À minha madrinha **Omarina** e a meu padrinho **Zezinho** (*in memorian*) pelo carinho e presença constante em minha vida. Amo vocês!

Aos meus avós **Amazonina** (*in memorian*), **Jatyr** (*in memorian*) e **Osmar** (*in memorian*) pelas doces lembranças e pela família linda que construíram.

À minha vizinha querida **Nazaré Gusmão**, que aos 92 anos mostra toda a vitalidade da mulher guerreira que sempre foi. Obrigada pelo seu amor, Vó. Você é um exemplo de vida e um orgulho para toda nossa família. Te amo!

À **Tereza** e à **D. Socorro**, pelo carinho e lealdade no decorrer de todos esses anos. Vocês são a minha família.

Ao amigo **Sergio de Stefano**. Obrigada pelo apoio, companheirismo e pelo presente mais lindo de todos, o meu irmãozinho!

À amiga **Susie dos Santos**. Obrigada por estar presente. Você, com toda a certeza, é essencial em nossas vidas.

A minha grande amiga **Larissa**. Larissão, talvez se eu juntar todas as cartas trocadas, mensagens e conversas (em português e inglês) não só dessa, mas de todas as fases da nossa vida eu poderia conseguir fazer um agradecimento digno da nossa amizade, mas, por hora, eu agradeço a sua lealdade, cumplicidade e paciência em todos os momentos dessa nossa jornada. Sem você a estrada não teria sido tão tranquila, muito menos tão divertida. Te amo!

Agradecimentos

À **Gabriela Bonafim**. Gabi, você foi um presente que Bauru me proporcionou. Fez da minha caminhada muito mais leve e prazerosa, dividiu angústias e sonhos comigo e essa é uma amizade que levarei para vida toda. Agradeço, também, por poder conviver com sua mãe, **Eliana**, e por compartilhares tua família comigo nos momentos em que eu mais senti a dor da saudade de casa.

Às minhas grandes amigas da época de graduação da UFAM **Maira, Carol, Ju, Mari e Tati**. Sou grata por compartilhar risadas, histórias e sonhos com vocês. E essa vitória também é nossa!

À minha família de Bauru, **Kika, Rafinha, Leti, Marcelinho, Bueno, Galego** e ao meu querido amigo **Brustinho** (*in memoriam*). Obrigada por todos os risos, lágrimas e experiências compartilhadas. Sou mais forte quando estou com vocês. Aqui ou “do outro lado”, vocês sempre serão meus irmãos!

Aos colegas da turma mestrado **Adriana, Aline, André, Dylton Karen, Laís, Mércia, Juliana, Jozely, Letícia, Vinícius e Yuri** pelos momentos agradáveis, experiências compartilhadas e pela companhia nesta jornada. Em especial aos amigos **Vini, Drica, André e Yuri**. Sinto-me orgulhosa e honrada por ter tido vocês como companheiros de estrada, pessoas verdadeiramente “do bem” que me auxiliaram não somente no meu crescimento profissional, mas também na minha evolução pessoal. Obrigada pelas risadas, discussões, UNOs e lembranças para toda uma vida. Cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração.

Aos colegas da turma do **Doutorado** em Reabilitação Oral da FOB-USP pelo intercâmbio de conhecimentos e agradável convivência.

Aos colegas que passaram pelo nosso grupo de pesquisa **Emílio Acosta, Flora Távora, Luciana Pinto, Matheus Jacobina e Paulo Maurício Silva**. Sem os seus legados não seria possível a realização deste trabalho. Em especial aos amigos **Flora e Matheus**, pela atenção, paciência, conselhos e confiança

depositada em mim ao passarem os conhecimentos adquiridos em mesma jornada acadêmica. Esta pesquisa foi fruto do trabalho de vocês. Obrigada!

Ao colega **Ronald Ordinola**, pela ajuda essencial no desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pela solicitude, paciência e ensinamentos enriquecedores. És um grande pesquisador!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo por meio da pessoa do diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, pela formação de uma comunidade da qual hoje faço parte que visa a excelência do ensino.

Aos funcionários do Departamento de Prótese Dentária e Clínica de Pós-Graduação, **Marcelo Giatti, Reivanildo, Cláudia, Debora, Cleusa e Hebe**, pela eficiência, disponibilidade, bom humor e carinho.

Aos funcionários **Marcelo, Márcia, Rafaela, Renato e D. Neusa**, do **CIP-1**, onde eu passei muitos dos meus dias de mestranda. Nenhum de vocês mediu esforços para me ajudar, por isso lhes sou muito grata. E além de todo o trabalho realizado, obrigada pelos risos e palavras de apoio nos momentos de dificuldades. Tenho um carinho especial por cada um de vocês! Obrigada!

Aos professores do departamento de Prótese Dentária da FOB-USP, **Prof. Dr. Accácio Lins do Vale, Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo, Prof. Dr. Gerson Bonfante, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, Prof. Dr. Paulo César Conti, Prof. Dr. Paulo Martins Ferreira, Prof. Dr. Pedro César Garcia de Oliveira, Prof. Dr. Renato de Freitas, Prof^a. Dr^a. Simone Soares, Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto e Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela** por todos os valiosos ensinamentos transmitidos.

Ao Professor **José Roberto Pereira Lauris**, pelo valioso auxílio nas interpretações estatísticas dos resultados desse trabalho.

À empresa **ACECIL** pela colaboração na esterilização dos espécimes utilizados nesta pesquisa.

À empresa **VIPI** pela parceria e confiança em mim nesta jornada.

À **Capes** pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO-UFAM) que fez de mim uma dentista apaixonada pela odontologia e pela pesquisa. Em especial a **Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira** que, em iniciação científica, me apresentou o mundo da pesquisa. Obrigada, também, a todos os professores que fizeram parte da minha formação. A vocês devo minha motivação pela incansável busca pelo conhecimento!

A todos aqueles que participaram para a realização desta pesquisa ou por algum instante cruzaram o meu caminho e fizeram da minha jornada mais leve e prazerosa. Muito obrigada!

Agradecimento Especial

Ao meu orientador **Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto**. Professor, lembro que, em uma de nossas primeiras reuniões, você fez questão, antes de qualquer discussão sobre projetos e horários, de me alertar quanto à jornada de dois anos em que eu estava prestes a adentrar. Disse que a parte acadêmica era muito importante, mas mais importante era que eu conseguisse absorver toda a experiência que o mestrado e tudo que viesse com ele pudesse me proporcionar. Nesse momento, então, eu me senti em casa e soube que ao final eu obteria mais do que um título de mestre, eu levaria no currículo uma experiência de vida maravilhosa. E a você sou muito grata por me mostrar e me guiar por esses caminhos.

Obrigada, Professor, pela paciência, pela confiança e pelos preciosos ensinamentos. Com toda a certeza você é um exemplo de orientador que eu ficarei muito orgulhosa em seguir.

"Não devemos exigir que a ciência nos revele a verdade. Num sentido corrente, a palavra verdade é uma concepção muito vasta e indefinida. Devemos compreender que só podemos visar a descoberta de realidades relativas. Além disso, no pensamento científico existe sempre um elemento poético. A compreensão de uma ciência, assim como apreciar uma boa música, requer em certa medida processos mentais idênticos. A popularização da ciência é de grande importância, se proceder de uma boa fonte. Ao procurar simplificar as coisas não se deve deformá-las. A popularização tem de ser fiel ao pensamento inicial. A ciência não pode, é evidente, significar o mesmo para toda a gente. Para nós, a ciência é em si mesma um fim, pois os homens da ciência são espíritos inquisidores. Mas não devemos esperar que todos comuniquem nas nossas concepções, e assim os profanos em matéria de ciência devem constituir objeto de uma especial consideração. A sociedade torna possível o trabalho dos sábios, alimenta-os. Tem pois o direito de lhes pedir por seu lado uma alimentação digestiva..."

Albert Einstein

Resumo

RESUMO

A proposta deste trabalho foi analisar um produto experimental (VIPI LTDA, Pirassununga, SP), que através da tecnologia sol-gel, modifica a superfície de resinas acrílicas para base de próteses e forma uma camada de nanopartículas de sílica (NPS) visando diminuir o acúmulo e facilitar a remoção de microrganismos. Dessa forma, inicialmente, confirmou-se a deposição de NPS e formação do revestimento cerâmico em polimetilmetacrilato (PMMA) através de espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR); e posteriormente, quantificou-se o biofilme de *Candida albicans* nesta superfície através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e microscopia confocal (MC). Um total de 51 espécimes (10x10x3mm) de PMMA foi confeccionado e distribuído aos experimentos designados. Para a análise da composição dos espécimes em FTIR, foram avaliados 3 grupos (n=1): CN- espécime que não recebeu tratamento algum; CP- espécime que recebeu a aplicação do primer do produto; CL- espécime que passou tanto pela aplicação do primer como pelo processo sol-gel. Na etapa seguinte, foram utilizados 48 espécimes divididos em 3 grupos (n=16), de acordo com o tipo de polimento: PM3- mecanicamente polido com 3µm de rugosidade média; PM03- mecanicamente polido com 0,3µm de rugosidade; PL- polido quimicamente pelo líquido conforme instruções do fabricante. Anteriormente aos experimentos, os espécimes foram esterilizados por óxido de etileno e, então, imersos em saliva artificial por 2hs para a formação da película adquirida. Em seguida, foram secos e inoculados com 2mL de suspensão de *C. albicans* (1.10^7 cel/mL) para adesão das células fúngicas durante 90min. Após esta fase, as amostras foram lavadas em solução salina e imersas em meio estéril (RPMI) para crescimento do biofilme em estufa sob agitação (12hs a 37°C). Metade do número das amostras de cada grupo (n=8) foi destinada a contagem de UFC/mL e a outra metade dos espécimes (n=8), foi designada ao método de MC, que com o auxílio de um software (BioImageL v.2), permitiu a determinação do biovolume total (µm³), biovolume de células viáveis (µm³), biovolume de células não-viáveis (µm³) e área de cobertura do campo pelo biofilme (%). Os dados obtidos pelo FTIR foram analisados através da estatística descritiva. Os resultados obtidos pelos experimentos de quantificação após teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foram analisados através do teste paramétrico ANOVA, seguido do teste de Tukey

para comparações entre grupos ($p < 0,05$). Através do FTIR, observou-se a deposição satisfatória da camada de NPS, permitindo assim, o desempenho dos experimentos de quantificação. Os resultados do UFC/ml e MC demonstraram semelhança na quantificação do biofilme entre os grupos PL e PM3, e diferença quando comparados ao grupo de superfícies mais lisas, PM03. Dessa forma, observou-se que o polimento líquido experimental não foi efetivo para a diminuição da colonização de biofilme de *C. albicans* em superfícies de PMMA. Entretanto, maiores investigações sobre as propriedades de superfície deste revestimento devem ser realizadas, já que o processo sol-gel permite uma facilidade na modificação dessas características, podendo levar ao desenvolvimento de um material de revestimento ideal.

Palavras-chave (DECS): *Candida albicans*; polimento dentário; nanopartículas; prótese total; microscopia confocal.

Abstract

ABSTRACT

In vitro study of *C. albicans* biofilm growth on heat-polymerized acrylic resin coated with silicon dioxide nanoparticles (ceramic coating)

This study investigates an experimental coating (VIPI LTDA, Pirassununga, SP) by sol-gel process that modifies acrylic resin denture base with silicon dioxide nanoparticles (SNP) to decrease *C. albicans* biofilm growth. Therefore, it was first investigated the presence of sol-gel ceramic coating on polymethylmethacrylate (PMMA) by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Then *C. albicans* biofilms were quantified by colony forming units (CFU/mL) and confocal scanning laser microscopy (CSLM). Fifty-one PMMA specimens were manufactured (10x10x3mm) and assigned to the experiments. To evaluate specimens' composition, it was analyzed three groups (n=1): CN- the specimen did not receive any surface treatment; CP- it was applied the coating primer on the specimen surface CL- the specimen was treated with the whole sol-gel process. In the following stage, 48 samples were divided into 3 groups (n=16) according to the polish type: PM3- 3 μ m of roughness mechanical polish; PM03- 0,3 μ m of roughness mechanical polish; PL- liquid polish. Samples of experimental group were coated according to manufacturer's instructions and all the samples were sterilized with ethylene oxide. After that, they were dipped in artificial saliva for 2hs to acquire the salivary pellicle, and then, dried and inoculated with 2 mL suspension of *C.albicans* (1.10^7 cel/mL) for 90 min. Then, specimens were washed and immersed in sterile RPMI solution (37°C for 12h). Half of the samples of each group (n=8) was assigned to each quantification test (UFC/mL and CSLM). By CSLM and software (BioImageL v.2) analysis was possible to obtain the total biovolume (μm^3), viable biovolume (μm^3), non-viable biovolume (μm^3), and covered area (%) by *C. albicans* biofilm. The data obtained by FTIR were analyzed by descriptive statistic. Whereas the records acquired by the quantification experiments were first analyzed by Kolmogorov-Smirnov normality test and then by one way ANOVA followed by Tukey's test to assess difference between groups ($p<0,05$). FTIR results showed an adequate SNP deposition, allowing the quantification tests to be performed. UFC/mL and CLSM records showed similarity between PL and PM3 groups and difference when comparing these groups to smoother surfaces group (PM03). Therefore, in this study, the experimental coating

was not effective to reduce colonization by *C. albicans* biofilm on PMMA surfaces. Nevertheless, further investigations are required since sol-gel ceramic coating process eases the features modification of the material, possibly leading to an ideal coating development.

Key words (MESH): *Candida albicans*; dental polishing; nanoparticles; complete dentures; confocal scanning laser microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Confeção dos espécimes.....	46
Figura 02 - Aplicação do produto experimental.....	48
Figura 03 - Espécime acondicionado no ATR para a leitura pelo espectrômetro.....	49
Figura 04 - Polimento mecânico dos espécimes.....	52
Figura 05 - Inoculação dos espécimes.....	55
Figura 06 - Processamento dos espécimes para cultura microbiológica.....	56
Figura 07 - Processamento dos espécimes para microscopia confocal.....	58
Figura 08 - Sequência padrão de análise dos 6 campos dos corpos de prova no microscópio.....	58
Figura 09 - Processamento das imagens digitais pelo software LAS AF Lite.....	59
Figura 10 - Avaliação do campo ($275\mu\text{m}^2$ por $1\mu\text{m}$ de z-step) em imagem tridimensional quanto a seu biovolume total, biovolume verde e biovolume vermelho através do software bioImageL v.2.....	60
Figura 11 - Avaliação do campo ($275\mu\text{m}^2$) quanto a sua área de cobertura pelo biofilme em imagem bidimensional através do software bioImageL v.2.....	60
Figura 12 - Espectros dos grupos CN, CP e CL sobrepostos.....	65
Figura 13 - Imagens em microscopia confocal do biofilme desenvolvido na superfície dos espécimes com rugosidade média de $3\mu\text{m}$	67
Figura 14 - Imagens em microscopia confocal do biofilme desenvolvido na superfície dos espécimes com rugosidade média de $0,3\mu\text{m}$	68
Figura 15 - Imagens em microscopia confocal do biofilme desenvolvido na superfície dos espécimes com polimento líquido.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Distribuição dos grupos de acordo com a fase do experimento e teste aplicado.....	43
Tabela 02 - Componentes da saliva artificial e suas respectivas concentrações.....	53
Tabela 03 - Números de onda importantes na avaliação da deposição das NPS.....	70
Tabela 04 - Valores médios e desvio padrão do UFC/mL, biovolume total (μm^3) e área de cobertura do substrato (%) dos três grupos testados.....	68
Tabela 05 - Valores médios e desvio padrão dos resultados de biovolume verde e biovolume vermelho dos três grupos testados.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ATR	Reflexão Total Atenuada
cels/mL	Células por mililitro
EP	Estomatite Protética
FTIR	Espectrometria no Infravermelho por Transformada de Fourier
mL	Mililitro
n	quantidade da amostra
nm	nanômetro
NPS	Nanopartículas de sílica
p	Nível de significância
PBS	Solução tampão fosfato-salina (Phosphate-buffered saline)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PT	Prótese Total
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por Mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.1	ESTOMATITE PRÓTÉTICA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA.....	27
1.2	DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	29
1.3	CARACTERÍSTICAS DE PROPENSÃO DE COLONIZAÇÃO POR <i>C. ALBICANS</i> DOS MATERIAIS PARA BASE DE PT.....	31
1.4	MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA PRÓTESE ATRAVÉS DE COATINGS.....	33
2	PROPOSIÇÃO	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS.....	43
3.2	FASE I- CONFIRMAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DA CAMADA DE DIÓXIDO DE SILÍCIO.....	44
3.2.1	Confecção das amostras para a confirmação da deposição da camada de dióxido de silício.....	44
3.2.1.1	Confecção dos padrões de silicone.....	44
3.2.2.2	Inclusão dos padrões de silicone.....	44
3.2.1.3	Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento de resina acrílica.....	45
3.2.1.4	Polimento líquido.....	47
3.2.2	Processamento e análise dos corpos de prova em FTIR.....	48
3.3	FASE II- ANÁLISE DO BIOFILME DE <i>C. albicans</i>	49
3.3.1	Confecção das amostras para a análise do biofilme de <i>C. albicans</i>.....	49
3.3.1.1	Polimento mecânico.....	50
3.3.1.2	Polimento líquido.....	51
3.3.2	Aferição da padronização da rugosidade superficial.....	51
3.3.3	Imersão em saliva.....	52
3.3.4	Inoculação dos espécimes.....	53
3.3.5	Formação do biofilme.....	54
3.3.6	Processamento dos espécimes para cultura microbiológica.....	55

3.3.7	Processamento dos espécimes para microscopia confocal.....	57
3.3.7.1	Análise dos espécimes no microscópio confocal.....	58
3.5	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	61
4	RESULTADOS.....	63
4.1	DA CONFIRMAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DA CAMADA DE NPS (FASE I).....	65
4.2	DA ANÁLISE DO BIOFILME.....	66
4.2.1	Análise qualitativa do biofilme.....	66
4.2.1.1	Grupo com polimento mecânico de 3 µm de rugosidade (PM3).....	67
4.2.1.2	Grupo com polimento mecânico de 0,3 µm de rugosidade (PM03).....	68
4.2.1.3	Grupo com polimento líquido (PL).....	69
4.2.2	Análise quantitativa do biofilme.....	70
5	DISCUSSÃO.....	73
5.1	DA METODOLOGIA.....	75
5.2	DOS RESULTADOS.....	77
6	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS.....	85

1 Introdução e Síntese

Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

As próteses totais (PTs), ainda hoje, podem ser consideradas como um dos principais recursos na reabilitação oral de pacientes totalmente desdentados. Próteses tais como PTs, próteses parciais removíveis e *overdentures* suportadas por dentes ou retidas por implantes possuem uma base de resina acrílica que tem por função substituir o tecido perdido e transferir as forças mastigatórias ao rebordo subjacente.

A substituição deste tecido oral por materiais restauradores estabelece condições para que estas superfícies sejam colonizadas por microrganismos, podendo favorecer a instalação da condição que mais afeta os usuários de próteses totais, a Estomatite Protética (EP).

Estima-se o aumento de pacientes usuários de PTs nas próximas décadas, principalmente devido à ampliação na expectativa de vida da população, apesar da taxa de edentulismo em si estar diminuindo (DOUGLASS; SHIH; OSTRY, 2002). Essa assertiva é válida principalmente para o Brasil, que ainda possui mais da metade de sua população idosa carente de tratamentos através de próteses totais ou parciais (FONESCA et al., 2013).

Por esta razão, a necessidade desses tipos de próteses, por longos períodos de tempo no futuro, pode ser previsível e como consequência, o número de pessoas em risco de desenvolver a estomatite protética ainda será considerável (GENDREAU; LOEWY, 2011).

1.1 Estomatite Protética: Características Clínicas, Epidemiologia e Etiologia

A estomatite protética (EP) é uma condição geralmente assintomática, porém uma pequena porcentagem dos pacientes portadores apresenta dor, prurido ou ardência (BUDTZ-JORGENSEN, 1974). É caracterizada clinicamente por uma inflamação e eritema da mucosa em contato com a prótese (ARENDORF; WALKER, 1987). Por esta razão, esta condição é usualmente diagnosticada durante exame de rotina através da presença de inflamação ou inchaço da mucosa. Estudos diversos

indicam um comprometimento de até 2/3 da população usuária de PTs (BUDTZ-JORGENSEN, 1978; WEBB et al., 1998; RAMAGE et al., 2004).

Em revisão sistemática, Gendreau e Loewy (2011) descreveram e organizaram informações de uma série de publicações referentes à epidemiologia da EP em diversos países. Em estudos com base populacional, a taxa de pacientes usuários de próteses removíveis que apresentavam EP variou de 14,7% a 65% (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; KOVAC-KOVACIC; SKALERIC, 2000; SHULMAN; BEACH; RIVERA-HIDALGO, 2004; MUMCU et al., 2005; SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005). Em estudos que avaliaram a prevalência de EP entre a população idosa tanto da comunidade em geral como moradora de lares de repouso, os relatos de prevalência de EP foram entre 15 e 71% (ESPINOZA et al., 2003; PELTOLA; VEHKALAHTI; WUOLIJOKI-SAARISTO, 2004; TRIANTOS, 2005; MARCHINI et al., 2006; FREITAS et al., 2008; THIELE et al., 2008).

Já em estudos que tinham como base pacientes que procuravam tratamento protético, ajustes ou trocas de próteses em clínicas reabilitadoras, o índice de prevalência da EP variou de 17 a 77%, com mais da metade dos estudos relatando uma prevalência igual ou maior a 45% (COCO et al., 2008; EMAMI et al., 2008; BARAN; NALCACI, 2009; MARCOS-ARIAS et al., 2009).

Para tentar explicar a divergência dos resultados dos estudos avaliados, os autores da revisão ressaltaram a diferença entre suas amostras. Alguns estudos com base populacional não possuíam uma amostra representativa, tornando questionável extrapolar seus resultados a um cenário mais abrangente, como a população de um país. Além disso, os autores observaram que, apesar de classificações da EP serem similares, alguns estudos não relataram a utilização de escores de presença/ausência e severidade de EP padronizados (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; GENDREAU; LOEWY, 2011).

A despeito da importância clínica e alta prevalência da estomatite protética, sua etiologia ainda não está completamente desvendada. No entanto, sabe-se que a EP é uma patologia multifatorial, de forma que, a vasta literatura sobre o assunto apresenta relatos da associação entre a EP e diversos fatores possivelmente causadores. Tais como o trauma da mucosa devido à adaptação deficiente da prótese, a idade avançada do usuário da prótese, o envelhecimento da prótese, a alergia ao monômero residual, a higiene deficiente e a infecção bacteriana e fúngica

(principalmente *Candida*) (KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; DIKBAS; KOKSAL; CALIKKOCAOGLU, 2006; GENDREAU; LOEWY, 2011). E em diversas publicações, a higiene deficiente e a infecção por *Candida albicans* parecem ter papéis principais no desenvolvimento dessa condição (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; WEBB et al., 1998; RAMAGE et al., 2004; GENDREAU; LOEWY, 2011)

1.2 Desenvolvimento do Biofilme de *Candida albicans*

As espécies de *Candida* se apresentam, muitas vezes, como microrganismos comensais, presentes em 20 a 50 % dos pacientes edêntulos (QUIRYNEN et al., 1990; SAMARANAYAKE, 1992). Contudo, tais microrganismos podem tornar-se patogênicos em situações em que o hospedeiro encontra-se predisposto à infecções (ODDS, 1997). A espécie mais comumente isolada nas próteses de pacientes com EP é a *Candida albicans* (CAMPOS et al., 2008).

A *C. albicans* é um fungo dimórfico com a habilidade de causar uma variedade de infecções, superficiais ou até mesmo fatais (RAMAGE et al., 2001; SARDI et al., 2013). Os principais fatores predisponentes para infecções por *C. albicans* são aqueles que comprometem o sistema imune do paciente, como a utilização de antibióticos, terapias imunossupressoras, infecção pelo vírus HIV, diabetes e idade avançada (ODDS, 1987; SANDVEN, 2000). Além disso, a utilização de dispositivos internos como *stents*, próteses de voz, prótese de joelho, próteses totais orais, lentes de contato, implantes mamários, implantes dentários, tubos endotraqueais, marca-passos e uma variedade de tipos de cateteres favorecem a formação de biofilme e a colonização por *C. albicans* (RAMAGE et al., 2001; RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006)

Alguns estudos indicam que infecções por *C. albicans* estão diretamente ligadas à formação e ao crescimento de seus biofilmes (RAMAGE; LOPEZ-RIBOT, 2005; MARTINEZ; FRIES, 2010), sendo comumente associados a infecções persistentes (CHANDRA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2008). Visto que biofilmes de *C. albicans* são altamente resistentes a agentes antifúngicos e, o tempo e a maturação do mesmo tende aumentar esta resistência (CHANDRA et al., 2001b; RAMAGE et al., 2001).

De acordo com Donlan e Costerton (2002), os biofilmes são conceituados como uma comunidade séssil de microrganismos caracterizada por células que formam microcolônias, e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo propriedades fenotípicas distintas. Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos e a células de defesa do hospedeiro (DONLAN, 2001; KUHN et al., 2002; CHANDRA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2008).

Os biofilmes de *C. albicans* aderidos a tecidos vivos e a superfícies abióticas parecem ter seus desenvolvimentos e arquiteturas distintos (DONGARI-BAGTZOGLOU et al., 2009). Biofilmes formados em superfície de biomateriais possuem dois tipos de células: leveduras e hifas. *In vitro*, a camada basal do biofilme é composta por leveduras de onde as células filamentosas emanam (FINKEL; MITCHELL, 2011). Estas células são embebidas em uma matriz extracelular amorfa, que é composta basicamente por β -glucano. Por ser um fungo dimórfico, a *C. albicans* tem a habilidade de transformar sua forma de levedura para hifa, que segundo alguns autores, é um dos principais determinantes da virulência desse microrganismo (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; WEBB et al., 1998; EMAMI et al., 2007). Esta transição é um fator crucial para a formação de biofilmes. Provavelmente, explicando o porquê de cepas mutantes que não passam por esta modificação não formarem biofilmes densos (BAILLIE; DOUGLAS, 1999; KRUPPA et al., 2004).

Nesse sentido, Chandra et al. (2001a) descreveram com detalhes a formação do biofilme de *C. albicans* em lâminas de polimetilmetacrilato (PMMA), a principal resina acrílica utilizada na confecção de bases de PTs. Nessas condições, o desenvolvimento do biofilme ocorreu, basicamente, em três fases distintas: a) fase inicial (0 a 11 horas); b) fase intermediária (aproximadamente 12 a 30 horas); c) fase de maturação (aproximadamente 38 horas a 72 horas). Inicialmente, as células leveduriformes de *C. albicans* aderiram-se à superfície da lâmina, posteriormente formando as microcolônias. No final da fase inicial (11ª hora), as comunidades de *C. albicans* apresentavam-se como um caminho robusto de células, devido ao

crecimento e agregação das colônias. O desenvolvimento da fase intermediária foi caracterizado pela emergência e predominância de substância não celular (polimérica), assemelhando-se a uma “névoa” cobrindo as microcolônias do fungo. Durante a fase de maturação, houve um aumento na quantidade de substância polimérica extracelular deixando as comunidades de *C. albicans* completamente cobertas por essa substância.

1.3 Características de propensão de colonização por *C. albicans* dos materiais para base de PT

À semelhança de outros microrganismos presentes na cavidade bucal, a *C. albicans* possui a habilidade de adesão às resinas das próteses totais, como mostra o trabalho de Chandra et al. (2001a) descrito anteriormente (CHANDRA et al., 2001a; CHANDRA et al., 2001b). A capacidade de adesão dos microrganismos e a velocidade de formação do biofilme nesses biomateriais dependem de alguns fatores como a exposição à saliva, a topografia da superfície e a composição dos materiais restauradores (RADFORD et al., 1998; TEUGHELIS et al., 2006; ARAI et al., 2009).

Diversos estudos demonstraram que superfícies rugosas são mais propensas ao acúmulo bacteriano e formação de placa do que superfícies lisas (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997; MORGAN; WILSON, 2001; RAMAGE et al., 2004; DA SILVA et al., 2010). Ramage et al. (2004), ao avaliarem biofilmes existentes nas próteses de usuários de PTs, observaram que os biofilmes tinham suas arquiteturas seguindo as irregularidades e sulcos da superfície dos materiais. Sugere-se que o desenvolvimento desse biofilme tenha sido a partir dessas imperfeições já que, os microrganismos que ali se aderem parecem estar protegidos das ações mecânicas de limpeza.

Por esta razão, o acabamento e o polimento de próteses são importantes aspectos no procedimento restaurador, pois a maioria dos microrganismos presentes na microbiota oral sobrevive, apenas, ao se aderir às microrrugosidades superficiais (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997). Entretanto, a porção interna da prótese, que se relaciona diretamente à mucosa do palato, não é passível

de polimento mecânico já que há a possibilidade de perda de contato da base protética com a mucosa, e consequente diminuição ou perda da função (JAGGER et al., 2002).

Sendo assim, dependendo do tipo de polimento e forma de confecção das próteses, a resina acrílica pode apresentar superfícies mais polidas, com rugosidade superficial (Ra) de 0,03 μm a 0,3 μm e superfícies mais rugosas variando de 1,2 μm a 3 μm de rugosidade (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997; NEVZATOGLU et al., 2007).

A natureza química da superfície dos biomateriais é outro fator que possui um papel importante no desenvolvimento de biofilmes de microrganismos em PTs. Materiais com uma maior energia livre de superfície são mais hidrofílicos (KANTA; SEDEV; RALSTON, 2005). Dessa forma, a energia livre de superfície pode influenciar na composição e na formação da película adquirida, sendo um fator importante na determinação da hidrofobicidade do material (SIPAHI; ANIL; BAYRAMLI, 2001; DA SILVA et al., 2010).

As espécies de *Candida* parecem aderir mais rapidamente a superfícies hidrofóbicas do que a superfícies hidrofílicas (YOSHIJIMA et al., 2010; ESTIVILL et al., 2011; FRADE; ARTHINGTON-SKAGGS, 2011; SINGH; SHIVAPRAKASH; CHAKRABARTI, 2011; KANG et al., 2013). No PMMA, isso ocorre devido à exposição de unidades monoméricas em sua superfície e interação com domínios hidrofóbicos de proteínas salivares formando fortes ligações hidrofóbicas (PARK; PERIATHAMBY; LOZA, 2003). Por conseguinte, as proteínas salivares interferem na adesão da *C. albicans*, aumentando sua adsorção nas superfícies do meio oral (DODDS; JOHNSON; YEH, 2005; MOURA et al., 2006). Superfícies mais hidrofóbicas também parecem apresentar maiores colonizações com *C. albicans* em forma de hifas, indicando um aumento da virulência do biofilme (EMAMI et al., 2007; YOSHIJIMA et al., 2010).

Devido a tais características dos materiais utilizados para a confecção para base de próteses, sabe-se que, em portadores de EP, a *Candida albicans* está presente tanto na mucosa do palato como na superfície interna da prótese (DE OLIVEIRA et al., 2010). Por esta razão, o tratamento dessa condição, deve abranger, além de instruções de higiene e outras medidas, a substituição da prótese já contaminada. Caso contrário, a exposição continuada da mucosa ao biofilme de

Candida já instalado na prótese pode levar a uma reinfecção (GENDREAU; LOEWY, 2011).

Corroborando a assertiva, Pires et al. (2002) relataram a resolução da EP em 64% de pacientes portadores dessa condição que, 6 meses antes haviam recebido instruções de higiene oral e substituído suas próteses antigas por novas. Os autores afirmaram que tal melhoria, provavelmente, se deu pela substituição das próteses e confecção de novas com material de qualidade superior.

Por esta razão, a resolução da EP, provavelmente, seja através da prevenção do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* (BLOSSEY, 2003; CUELLAR-CRUZ et al., 2012). De tal forma que, a maioria das publicações atuais concernentes a este assunto estejam voltadas a minimizar as características dos biomateriais que favorecem a colonização pelos microrganismos. Portanto, a modificação de superfície, através de películas de revestimento (*coatings*) ou de modificação da composição dos materiais em si, aparenta ser o futuro para a prevenção da EP (NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998; MONTEIRO et al., 2009; VON FRAUNHOFER; LOEWY, 2009; GENDREAU; LOEWY, 2011; ZAMPERINI et al., 2011; COCHIS et al., 2012; LAZARIN et al., 2013).

1.4 Modificação da superfície da prótese através de *coatings*

Os polimentos líquidos são produtos, que ao formar uma camada de revestimento na superfície dos materiais, modificam-nas com o objetivo de diminuir o crescimento de biofilme microbiano. Tais camadas são geralmente formadas por resinas fluidas fotopolimerizáveis que não sofrem inibição por oxigênio (SAYINSU et al., 2007). Estes produtos preenchem as ranhuras e imperfeições das resinas acrílicas e dessa forma, diminuem a rugosidade superficial. Sua composição muitas vezes, modifica também, a energia livre e a hidrofobicidade da superfície da resina acrílica, que são outras características que influenciam na adesão de microrganismos em bases de prótese (PARK; PERIATHAMBY; LOZA, 2003; LAZARIN et al., 2013).

Budtz-Jorgensen & Kaaber (1986) avaliaram *in vivo* um sistema de polimento líquido (Perma Link / Perma Cure System, G. C. Internat. Cooperation, Tokyo,

Japan), onde na primeira semana observaram a diminuição do acúmulo de biofilme e ao final de um mês notou-se uma redução nos quadros de EP. No entanto, os autores já previam que, apesar dos bons resultados, deveria haver uma melhora na composição da camada de polimento líquido para que houvesse a deposição de uma película mais uniforme (BUDTZ-JORGENSEN; KAABER, 1986; MONSENEGO, 2000)

Avaliando outro produto de polimento líquido (Palaseal, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany), Sesma et al. (2005) observaram que a diminuição da adesão de *C. albicans* devia-se ao fato do polimento líquido facilitar a remoção do biofilme e não necessariamente, prevenir a colonização. Entretanto, após três meses, os autores observaram um aumento da adesão de microrganismos em algumas áreas da superfície tratada devido à degradação e à presença de microfraturas na camada de polimento líquido.

Nesse sentido, Jacobina (2012), em dissertação de mestrado, avaliou um sistema de polimento líquido (Biscover LV, Bisco, Schaumburg, USA) *in vitro* quanto a sua efetividade mesmo após 30 e 90 ciclos de limpeza química com hipoclorito de sódio a 1%. E apesar dos resultados positivos, tal sistema de polimento líquido possui um valor de mercado elevado e para a realidade social brasileira o custo-benefício da sua utilização é questionável .

Dessa forma, os produtos modificadores de superfície, idealmente, devem ser biocompatíveis, resistentes à longo prazo à limpeza mecânica e química e, além disso, devem ter um preço acessível aos usuários de próteses totais. Para tanto, outros materiais utilizados como *coatings* de resinas para base de próteses vêm sendo estudados, como polímeros hidrofílicos, polímeros zwitteriônicos, polímeros com adição de antifúngicos, biosurfactantes, dióxido de titânio, parilene, revestimento com plasma, etil-cianoacrilato, entre outros. (YILDIRIM et al., 2005; PARK et al., 2008; ARAI et al., 2009; REDDING et al., 2009; ZHOU et al., 2010; TÁVORA, 2011; ZAMPERINI et al., 2011; COCHIS et al., 2012; LAZARIN et al., 2013).

Uma tecnologia amplamente utilizada em diversas áreas para a obtenção de revestimentos de diferentes materiais é o processo sol-gel. Estes revestimentos utilizados na óptica, eletrônica e biomedicina, modificam as propriedades do material como dureza, abrasão, degradação, resistência a solventes, hidrofobicidade, entre

outras para diversas finalidades (CHIRIAC et al., 2010). Esta técnica permite a obtenção de uma camada delgada de cerâmica quimicamente aderida ao substrato orgânico, podendo ser resistente a diversos agressores. No entanto, apesar de várias publicações neste âmbito, este processo ainda não foi devidamente estudado para a confecção de revestimentos em resinas acrílicas para base de próteses com a finalidade de diminuir a adesão de biofilmes de *C. albicans*.

Historicamente, a principal limitação da utilização de um revestimento de vidro em materiais orgânicos diversos, como o PMMA, era seu processamento tradicional, que envolve temperaturas extremamente altas. No entanto, a descoberta do processo sol-gel da dióxido de silício (SiO_2), em meados do século XIX, abriu um leque de possibilidades para novas aplicações da cerâmica em materiais orgânicos (CORADIN; BOISSIERE; LIVAGE, 2006).

O dióxido de silício, também chamado de sílica, é o principal componente de vidros e cerâmicas, sendo amplamente utilizado na odontologia para a confecção de cimentos de ionômero de vidro, compósitos e sistemas adesivos, além de cerâmicas odontológicas (LUHRS; GEURTSSEN, 2009). Produtos com a tecnologia de nanopartículas vêm sendo desenvolvidos e testados quanto ao seu potencial de controle de formação de biofilme na cavidade oral, devido a sua capacidade anti-microbiana, anti-adesiva e de administração de medicamentos (HANNIG et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; ALLAKER, 2010; BOTEQUIM et al., 2012). Associando as propriedades da sílica com a tecnologia de nanopartículas, Cousins et al. (2007) observaram que, em superfícies de poliestireno revestidas com nanopartículas de sílica (NPS) ocorreu uma diminuição de adesão de *C. albicans*.

A formação dos revestimentos de sílica através da técnica de molhamento do processo sol-gel consiste em uma suspensão de partículas (sol), geralmente compostos metálicos, como silicatos ou alcóxidos de silício, que agem como precursores da dispersão. Esses compostos passam, então, por hidrólise e policondensação em temperatura ambiente, permitindo a formação de partículas de tamanho coloidal (sílica). Em seguida, reações químicas conectam essas partículas, solidificando o “sol” e formando um sistema integrado por uma estrutura tridimensional rígida de partículas coloidais ou de cadeias poliméricas, constituindo assim, o gel. Esta camada gelatinosa ao desidratar, então, forma um filme cerâmico

delgado (BEN-NISSAN; CHOI, 2006; CORADIN; BOISSIERE; LIVAGE, 2006; CHIRIAC et al., 2010).

O processo sol-gel é uma técnica que permite o revestimento de substratos de diferentes configurações e formatos, tendo utilização na confecção de biodispositivos, como cateteres intravasculares, que possuem forma tubular. Outra vantagem desta técnica é a homogeneidade e pureza química em escala molecular dos filmes formados (BEN-NISSAN; CHOI, 2006). Além disso, é uma tecnologia versátil, simples, que não necessita de equipamentos dispendiosos e é considerada ecologicamente correta por ser econômica em relação à energia e recursos utilizados (CHIRIAC et al., 2010).

Portanto, em virtude da necessidade do aperfeiçoamento das propriedades dos materiais para base de prótese, uma empresa brasileira (VIPI Ind e Com. de produtos odontológicos LTDA, Pirassununga, SP) desenvolveu um produto que forma uma camada delgada e homogênea de nanopartículas de sílica (camada cerâmica) sobre estes materiais através do processo sol-gel, visando a diminuição da colonização do biofilme de *C. albicans*. Para melhor elucidação da qualidade de um novo produto, inúmeros testes devem ser feitos para se aferir a sua eficácia. O fato de possuir a tecnologia sol-gel associada a partículas nanométricas de sílica, nos propusemos a investigar o acúmulo de biofilme de *C. albicans* em superfícies tratadas com o polidor líquido experimental.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi:

- Confirmar a presença da camada de nanopartículas de dióxido de silício na superfície de uma resina acrílica termopolimerizável tratada com produto experimental (VIPI Ind e Com. De produtos odontológicos LTDA, Pirassununga, SP) mediante avaliação por Espectrometria no Infravermelho por Transformada de Fourier.
- Quantificar a formação de biofilme de *Candida albicans* na superfície tratada com o produto através de microscopia confocal e contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

3 *Material e* *Métodos*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Distribuição dos grupos

Em fase inicial (Fase I), foi avaliada a presença ou não da camada depositada de sílica nos espécimes. Foram 3 grupos avaliados: espécime que não recebeu qualquer tratamento em sua superfície (CN), espécime que recebeu o polimento líquido (CL) e amostras que recebeu apenas o primer do produto (CP). Cada grupo (n=1) teve sua amostra destinada a avaliação por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Tabela 1).

Para os experimentos da análise e quantificação do biofilme de *C. albicans* (Fase II), as amostras foram agrupadas aleatoriamente de acordo com o tratamento dado a superfície a ser avaliada: polimento mecânico de 3 μm de rugosidade (PM3); polimento mecânico de 0,3 μm de rugosidade (PM03); e polimento líquido posterior ao polimento mecânico de 3 μm de rugosidade (PL). Foi um total de 3 grupos (n=16), onde em cada grupo, 8 amostras foram destinadas a análise em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) e 8 amostras a análise em microscopia confocal (Tabela 1).

	Testes	Grupo
Confirmação da camada (Fase I)	FTIR	CN (n=1)
		CP (n=1)
		CL (n=1)
Quantificação do Biofilme (Fase II)	UFC/mL	PM3 (n=8)
		PM03 (n=8)
		PL (n=8)
	Confocal	PM3 (n=8)
		PM03 (n=8)
		PL (n=8)

Tabela 1: Distribuição dos grupos de acordo com a fase do experimento e teste aplicado.

3.2 Fase I – Confirmação da deposição da camada de dióxido de silício

3.2.1 Confeção das amostras para a confirmação da deposição da camada de dióxido de silício (Fase I)

3.2.1.1 Confeção dos padrões de silicone

Para confecção dos padrões de silicone, foi utilizada uma matriz acrílica, de forma retangular contendo 36 espaços quadrangulares com medidas de 10 mm de comprimento, 10 mm de largura e 4 mm de altura. A matriz foi preenchida com silicone de condensação de uso laboratorial (Labor Mass, VIPI produtos odontológicos LTDA, Pirassununga, SP) e prensada entre duas placas de vidro (JON Com de produtos odontológicos LTDA, São Paulo, SP) previamente isoladas com vaselina sólida (Hemafarma Com. e Ind. farmacêutica LTDA, São Gonçalo, RJ), sob peso de 5 kg, por aproximadamente 10 minutos (Figura 1A). Em seguida, o padrão de silicone foi removido da matriz, os excessos foram cortados com auxílio de uma lâmina de bisturi, e os padrões sem defeitos selecionados (JACOBINA, 2012).

3.2.1.2 Inclusão dos padrões de silicone

As muflas metálicas de latão polido com pino nº 6 (Mac Artigos odontológicos e prótese Ind. e Com. LTDA, São Paulo, SP), foram isoladas com vaselina sólida para a inclusão dos padrões de silicone em gesso tipo III (Gesso Pedra Herodent, Vigodent S/A Ind. e Com., Rio de Janeiro, RJ). Posteriormente ao isolamento das muflas, o gesso foi manipulado e espatulado conforme orientações do fabricante, em cuba de borracha (Dentalbrand Comercial, São Paulo, SP) com espátula para gesso (Indusbello Ind. de Instr. Odontológicos, Londrina, PR), sob vibração. O gesso, então, foi despejado na mufla até que houvesse quantidade suficiente para que os padrões de silicone pudessem ser submersos, assim iniciasse seu processo de presa (PINTO, 2007) (Figura 1B).

Esperado o tempo de presa do gesso, foi aplicado o isolante Cel-Lac (S.S. White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ) em toda superfície. Assim como a mufla, a contra-mufla também recebeu uma camada de vaselina sólida nas suas superfícies internas e posteriormente foi posicionada e devidamente preenchida com gesso tipo III, conforme condições técnicas descritas anteriormente. As muflas permaneceram na prensa hidráulica (VH Equipamentos médicos Odont. Acess. LTDA., Araraquara, SP) com 0,5 Kgf de pressão, por 1 hora (Figura 1C). Então, foram abertas para a remoção das matrizes de silicone e realização do exame do molde no gesso, a fim de verificar a presença de bolhas (PINTO, 2007).

3.2.1.3 Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento da resina acrílica

Para prensagem e confecção dos espécimes, foi utilizada a resina acrílica incolor termopolimerizável VIPI CRIL PLUS (VIPI Ind. e Com. De produtos odontológicos LTDA, Pirassununga, SP), homogeneizada com auxílio de uma espátula nº 31 (SS White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, RJ) em recipiente de vidro (Paladon, Pr. Ind. e Comércio de produtos odontológicos, Florianópolis, SC), utilizando-se a proporção conforme orientações do fabricante (Figura 1D). O interior dos moldes de gesso foi isolado com isolante Cel-Lac, com auxílio de um pincel de pelo de marta (Condor, nº456, Condor S.A., São Bento do Sul, SC) e preenchido com a resina acrílica na fase plástica. A base da mufla foi coberta com um filme de polietileno de alta densidade e fechada com a sua respectiva porção superior para ser prensada em prensa hidráulica sob pressão inicial de 0,5 kgf (Figura 1E).

No momento em que o ponteiro da prensa hidráulica apresentou-se estável, a pressão foi aumentada lentamente para 1 kgf. Em seguida, a mufla foi aberta, a película retirada e o excesso de material removido com o auxílio de uma espátula Lecron (S.S. White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, RJ). A mufla, então, foi novamente levada à prensa para a prensagem definitiva de 1,250 kgf de pressão. Antes da polimerização, a resina foi deixada para “descansar” por 30 minutos na mufla, seguindo orientações do fabricante (PINTO, 2007).

Decorrido esse período, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável (Metal Vander Aparelhos para Ortodontia, Piracicaba, SP), passível de ser utilizada em polimerizadoras digitais, e levada à polimerizadora microprocessadora digital em água, modelo Banho Maria (Solab, Piracicaba, SP) (Figura 1F). A programação da termopolimerização consistiu no aumento da temperatura da água até 65 °C durante 30 minutos e estabilização durante 60 minutos. Em seguida, elevação da temperatura por 30 minutos até atingir 100 °C, e estabilização por mais uma hora. Finalizado o ciclo de termopolimerização e o resfriamento completo da mufla, esta foi removida da microprocessadora digital. Ao final da demuflagem, foram obtidos padrões de resina acrílica, medindo 10 mm x 10 mm x 4 mm, nos quais foi realizado o acabamento com o auxílio de fresa de tungstênio em baixa velocidade (SARTORI et al. (2006) (Figura 1G e 1H).

Figura 1- Confeção dos espécimes. Placas de vidro, matriz acrílica e padrões de silicone confeccionados (A). Padrões de silicone em mufla imobilizados em gesso tipo III (B). Mufla em prensa hidráulica (C). Mistura de pó e líquido de resina acrílica incolor termopolimerizável (D). Moldes de gesso em mufla preenchidos com resina acrílica na fase plástica e cobertos com um filme de polietileno de alta densidade (E). Mufla em prensa de aço inoxidável (F). Espécimes de resina acrílica sem acabamento e polimento (G). Fresa de tungstênio para o acabamento do espécime (H).

Em seguida, as amostras foram submetidas à limpeza em ultrassom (Ultrasonic Cleaner USC 700, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., Indaiatuba, SP, Brasil) por 20 minutos em água destilada, para remoção dos detritos da superfície da resina (PEREIRA-CENCI et al., 2007). Ao final foram obtidas 3 amostras de resina acrílica. Uma superfície de cada amostra foi selecionada aleatoriamente para ser polida e avaliada. Para sua identificação, foi realizada uma marcação com uma broca de tungstênio na face oposta.

3.2.1.4 Polimento líquido

O polimento líquido foi realizado através de um produto que consiste em um primer fotopolimerizável e duas ampolas contendo soluções reagentes e instáveis ao entrar em contato (Figura 2A). A solução “A” tem em sua composição silicato e álcool etílico. A solução “B” tem como constituinte ácido clorídrico diluído e álcool etílico. Com a mistura das soluções, as nanopartículas de dióxido de silício decantam e é possível a sua deposição em superfícies previamente tratadas com o primer fotopolimerizável.

Dessa forma, aplicou-se o primer fotopolimerizável, com o auxílio de um pincel pelo de marta 308 (Tigre® SA), na superfície a ser tratada (Figura 2B). O espécime, então, foi levado à unidade fotopolimerizadora com quatro lâmpadas halógenas multifocais, Fotoceram Evolution (FOTOCERAM, Goiânia, GO) durante 4 minutos para que ocorresse a polimerização do primer (Figura 2C). Em seguida, foram misturadas as duas soluções reagentes em um Becker e o espécime submerso. A amostra permaneceu submersa durante 24 horas para que houvesse a decantação das nanopartículas de dióxido de silício (Figura 2D). Em seguida, o espécime foi lavado com água corrente e seco em papel absorvente.

Figura 2- Aplicação do produto experimental. Aplicação do primer fotopolimerizável (A). Polimerização do primer em unidade fotopolimerizadora por 4 minutos (B). Apresentação do primer e das soluções A e B (C). Imersão dos espécimes na mistura das soluções por 24 hs (D).

3.2.2 Processamento e análise dos espécimes em FTIR

A espectroscopia no infravermelho por transformada Fourier (FTIR) das amostras foi realizada com a finalidade de conferir se, realmente, houve a deposição da camada de nanopartículas de dióxido de silício nas superfícies tratadas dos espécimes, já que o revestimento obtido é delgado e dificilmente visível a olho nu.

As amostras avaliadas foram imersas, individualmente, em 20 mL de clorofórmio, visando o condicionamento da superfície para a leitura pelo espectrômetro Spectron BX FTIR (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). Em seguida, o espécime foi acondicionado no acessório de reflexão total atenuada (ATR) acoplado ao espectrômetro e deixado ali por 5 minutos para o restante do solvente evaporar (Figura 3).

Figura 3- Espécime acondicionado no ATR para a leitura pelo espectrômetro.

A leitura em branco inicial, denominada de referência (*Scan Background*), foi realizada anteriormente à leitura da amostra (*Scan Sample*) para que, nos resultados adquiridos, esses valores pudessem ser subtraídos dos valores obtidos da amostra. Esse procedimento foi repetido para todas as amostras avaliadas. O alcance de comprimentos de onda nas leituras foi estabelecido entre 4000 e 600cm^{-1} com uma resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$ e intervalo de $1,0\text{ cm}^{-1}$. A partir desses parâmetros, foi obtido o interferograma de cada amostra e então, um gráfico (espectro) foi construído pela transformação de Fourier com número de onda em cm^{-1} no eixo horizontal e transmitância em porcentagem no eixo vertical (%T).

3.3 Fase II- Análise do biofilme de *C. albicans*

3.3.1 Confeção das amostras para a análise e quantificação do biofilme de *C. albicans*

Para a análise e quantificação do biofilme de *C. albicans* (Fase II) foi confeccionado um total de 48 amostras em condições técnicas descritas anteriormente nos itens 4.2.1.1; 4.2.1.2; 4.2.1.3. Após acabamento e limpeza, as amostras receberam o tratamento de superfície referente ao grupo a que foram designadas: polimento mecânico de $3\text{ }\mu\text{m}$ de rugosidade (PM3; $n=16$), polimento

mecânico de 0,3 μm de rugosidade (PM03; n=16) e polimento líquido posterior ao polimento mecânico de 3 μm de rugosidade (PL; n=16).

3.3.1.1 Polimento mecânico

Apenas uma superfície de cada amostra foi selecionada aleatoriamente para ser polida e avaliada. Então, realizou-se uma marcação com broca de tungstênio na face oposta para identificação da superfície a ser examinada.

As 48 amostras tiveram sua superfície polida mecanicamente em uma politriz metalográfica (APL 4, Arotec, Cotia, SP) com um dispositivo de aço inoxidável redondo com um orifício central que permitiu o posicionamento e fixação da amostra através da tensão superficial com a interposição de uma gota d'água. O orifício redondo tem medidas exatas para receber um espécime quadrangular de 10 mm x 10 mm, e sua profundidade é de 3 mm para limitar o desgaste durante o polimento (Figura 4A). A politriz metalográfica é capaz de realizar um polimento simultâneo em seis espécimes, proporcionando uma padronização de rugosidade e paralelismo entre as superfícies polidas.

Do total das 48 amostras, 32 foram polidas visando à obtenção de uma rugosidade de 3 μm para simular a porção interna da prótese total (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997). Tal polimento foi realizado com lixa *carbide* (3M, Sumaré, SP) de granulação 80 com carga de 260 g durante 20 segundos, em baixa velocidade e sob refrigeração abundante (Figura 4B e 4C).

Já os 16 espécimes restantes, receberam um polimento simulando a face externa da prótese, com rugosidade de 0,3 μm (QUIRYNEN et al., 1990) (Figura 4C). Este polimento foi realizado com lixa de silicone *carbide* (3M, Sumaré, SP) de granulação 600 e 1200, com carga de 260 g durante 30 segundos cada, em baixa velocidade e sob refrigeração (JACOBINA, 2012) (Figura 4B e 4C).

As lixas foram substituídas a cada seis superfícies polidas e as amostras submetidas à limpeza em ultrassom por 20 minutos em água destilada, entre as trocas de granulação e final do polimento, a fim de remover os grânulos remanescentes (PEREIRA-CENCI et al., 2007) (Figura 4D). Posteriormente, todos

os espécimes foram individualmente submergidos em 2 mL de água destilada em placas de 24 poços e acondicionados em estufa a 37°C durante 48 horas, conforme as normas da ISO 1567:1988 (International Organization for Standardization Specification 1567, 1988) visando a eliminação de monômero residual (Figura 4E).

3.3.1.2 Polimento líquido

Das 32 amostras que receberam o polimento mecânico de rugosidade equivalente a 3 μm , 16 foram selecionadas aleatoriamente para receber o produto experimental (VIPI Ind e Com. De produtos odontológicos LTDA, Pirassununga, SP). O polimento líquido foi realizado conforme descrito no item 3.2.1.4.

3.3.2 Aferição da rugosidade superficial

Ao final do polimento mecânico, todas as 48 amostras tiveram suas superfícies mensuradas através do aparelho rugosímetro Surftest SJ-301 (Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan), com a finalidade de verificar a padronização da rugosidade média. Foram realizadas três leituras verticais e horizontais na superfície dos espécimes, sendo considerada a média aritmética (R_a) entre os picos e vales percorridos pela ponta ativa do aparelho, com percurso de medição de 2 mm, comprimento de onda limite de 0,8 mm e velocidade de 0,5 mm/s (VALENTINI et al., 2013) (Figura 4F).

Figura 4- Polimento mecânico dos espécimes. Dispositivo utilizado para auxílio no polimento dos espécimes (A). Lixas utilizadas no polimento dos espécimes (B). Espécimes polidos com $0,3\ \mu\text{m}$ de rugosidade média ($n=16$) a esquerda, e espécimes polidos com $3\ \mu\text{m}$ de rugosidade média ($n=32$) a direita (C). Limpeza ultrassônica dos espécimes (D). Espécimes imersos durante 48 h em água destilada para liberação do monômero residual (E). Aferição da rugosidade superficial dos espécimes através de rugosímetro (F).

Após a análise da rugosidade e polimento líquido, todos os espécimes foram embalados individualmente para esterilização por óxido de etileno (Acecil – Central de esterilização comércio e indústria, Campinas, SP) (SILVA et al., 2006; MIMA et al., 2008).

3.3.3 Imersão em saliva

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

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

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

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

Para a formação da película adquirida, os espécimes foram imersos individualmente em uma placa de cultura celular de 24 poços (TPP, Switzerland) com 2 mL da saliva artificial, durante 2 horas à 37°C (HAHNEL et al., 2008; BURGERS et al., 2010; HAHNEL et al., 2010). Decorrido este período, os espécimes foram secos à temperatura ambiente por 30 minutos, quando então, foram inoculados com o patógeno.

3.3.4 Inoculação dos espécimes

Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Centro Integrado de Pesquisa-1 (CIP-1) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Para tais procedimentos, utilizou-se, em condições assépticas, capela de fluxo laminar (modelo FLV-808/3, Filterflux®, Piracicaba, SP) previamente desinfetada com álcool 70° (Figura 5A).

O microrganismo *Candida albicans* SC 5314 (GILLUM; TSAY; KIRSCH, 1984; DA SILVA et al., 2010) foi reativado de sua cultura original a -80°C (solução contendo 20% de glicerol) em 20 mL de meio de cultura, e incubado durante 24 h a 37° C em agitadora a 150 rpm (DA SILVA et al., 2011) (Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos LTDA, Vargem Grande do Sul, SP), em condições aeróbias. Após 24 horas, foi realizada a centrifugação (Centrifuge 5804R, Eppendorf) da suspensão por 10 minutos a 24°C, com velocidade de 5.000 rpm para separação dos microrganismos do sobrenadante. Os fungos isolados foram lavados

2 vezes em PBS estéril (Mercker), para remoção de impurezas e o pellet final foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Em seguida, foram retirados 10 µL da suspensão e diluídos em PBS na proporção de 1: 10.000. A contagem dos fungos foi realizada em câmara de Neubauer (BIZERRA et al., 2008) e a concentração ajustada em número de células/mL (Figura 5B). Este procedimento assegurou a preparação de uma suspensão celular com uma concentração final de 1×10^7 cels/mL em PBS (CHANDRA et al., 2001b) (Figura 5C).

3.3.5 Formação do biofilme

Utilizando uma pinça estéril (S.S. White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, RJ), cada amostra foi colocada em um poço de uma placa de 24 poços (TPP, Switzerland), no qual foi dispensado 2 mL da suspensão celular, através de pipetas e ponteiros descartáveis, deixando os espécimes totalmente submersos (Figura 5D). Inicialmente, todas as amostras foram deixadas em cultura com *C. albicans* em incubadora com agitação orbital (Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos LTDA, Vargem Grande do Sul, SP) por 90 minutos a 37°C, com agitação de 75 rpm (CHANDRA et al., 2001b; DA SILVA et al., 2010) (Figura 5E).

Cessado os 90 minutos, os espécimes foram suavemente lavados individualmente, duas vezes, em 2 mL de PBS estéril (RAMAGE et al., 2004; DA SILVA et al., 2011) para garantir a remoção de células não aderidas ao material. A seguir, os espécimes já inoculados foram inseridos em 2 mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640, Gibco®) (KUCHARIKOVA et al., 2011), e incubados em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm (KUMAMOTO, 2002) durante 12 horas para o desenvolvimento do biofilme (CHANDRA et al., 2001a; BIZERRA et al., 2008) (Figura 5E). O biofilme de *Candida albicans* desenvolvido nos espécimes pode, então, ser avaliado através da contagem de unidade formadora de colônias por mililitro (UFC/mL) ou pela análise de microscopia confocal.

Figura 5- Inoculação dos espécimes. Capela de fluxo laminar (A). Câmara de Neubauer para contagem dos fungos (B). Suspensão celular de *C. albicans* a 1×10^7 cels/mL (C). Espécimes imersos individualmente em inóculo de *C. albicans* em placa de 24 poços (D). Incubadora agitadora utilizada para a inoculação dos espécimes (37°C a 75 rpm por 90 min) e para o desenvolvimento do biofilme em RPMI (37°C a 75 rpm por 12 h) (E).

3.3.6 Processamento dos espécimes para cultura microbiológica

Cessado o período de desenvolvimento do biofilme, cada amostra foi retirado do poço da placa de cultura e lavado gentilmente, em 2 mL de PBS estéril e colocado em tubo de ensaio, contendo 1000 μL de PBS, de forma que o espécime ficasse submerso na solução. Em seguida, o tubo de ensaio foi imerso em aparelho ultrassom (Ultrasonic Cleaner 1440D, Odontobrás, Ribeirão Preto, São Paulo) por 20 minutos para o desprendimento do biofilme de *C. albicans* da resina acrílica (SILVA, 2009) (Figura 6A).

A partir da obtenção dos 1000 μL da suspensão fúngica, foram realizadas diluições seriadas em PBS, obtendo-se diluições entre 10^{-1} a 10^{-4} desta suspensão (Figura 6B). Através de estudo piloto, observou-se que as diluições ideais para a contagem de microrganismos após semeadura foram de 10^{-3} e 10^{-4} . Então, alíquotas de 50 μL dessas diluições foram plaqueadas em duplicatas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco®, Detroit, Michigan, EUA) com

cloranfenicol (Figura 6C). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas (SILVA, 2009).

Figura 6- Processamento dos espécimes para cultura microbiológica. Tubos de ensaio contendo 1 mL de PBS e espécime inoculado com biofilme em aparelho ultrassom por 20 min (A). Quatro diluições da suspensão inicial (B). Ágar Sabouraud Dextrose sendo despejado em placas de Petri (C).

Encerrado o período de incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias com características de leveduras do gênero *Candida*. Em seguida, estes valores foram transformados para número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Para esse cálculo, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3 ou 4), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas sementeiras das placas. No presente estudo, $q = 0,050$ já que foram pipetados 50 μL para cada diluição. A média das 2 placas de cada espécime foi utilizada como valor final de contagem. Os valores de cada grupo foram catalogados para posterior avaliação estatística.

3.3.7 Processamento dos espécimes para microscopia confocal

Concluído o período de desenvolvimento do biofilme nos espécimes em meio de cultura (RPMI 1640) foi realizada a dupla lavagem em 2 mL de PBS. Em seguida, cada espécime foi transferido a um poço da placa de 24 poços, contendo 1 mL de PBS, adicionado 1 μ L de cada uma das duas soluções (A e B) do kit de viabilidade LIVE/DEAD® *Badlight*™ L7007 (Molecular Probes, Invitrogen Brasil Ltd., São Paulo, SP), conferindo 1% de concentração a mistura (Figura 7A). As soluções A e B do kit possuem concentrações diferentes do corante verde fluorescente, SYTO®-9 e do corante vermelho fluorescente, iodeto de propídeo. Esses corantes diferem na habilidade de penetrar em microrganismos vivos. De forma que, o corante SYTO®-9 conseguem adentrar tanto em microrganismos que possuem uma membrana citoplasmática intacta (viáveis), como naqueles que apresentam membranas danificadas (inviáveis). Já o iodeto de propídeo consegue penetrar, apenas, em microrganismos que possuem membranas comprometidas. Assim, as células viáveis adquirem a coloração verde fluorescente e às células inviáveis, a coloração amarelo-avermelhada decorrente da influência tanto do SYTO®-9 como do iodeto de propídeo (DA SILVA et al., 2011). A concentração de 1% de corante utilizada neste experimento foi ajustada durante os ensaios piloto de modo a proporcionar um melhor contraste entre as células fúngicas e a resina acrílica. Na sequência, foram aguardados 15 minutos para que houvesse a difusão dos fluorocromos no biofilme (JIN et al., 2005; GONG et al., 2013) Este processo foi realizado na ausência de luz a 37°C, de acordo com as orientações do fabricante.

Em seguida, 2 espécimes foram cuidadosamente montados em lamínula de vidro associada a óleo de imersão, com a face a ser avaliada voltada para baixo, para análise do biofilme em microscópio confocal Leica TCS – SPE (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha). A objetiva usada foi uma lente de imersão em óleo (40x; abertura numérica de 1,15) (Figura 7B).

Figura 7- Processamento dos espécimes para microscopia confocal. Kit de viabilidade LIVE/DEAD® BacLight™ L7007 (A). Dois espécimes com a face a ser avaliada voltada para baixo em lamínula de vidro (B).

3.3.7.1 Análise dos espécimes no microscópio confocal

A aquisição das imagens foi realizada de maneira padronizada em 6 diferentes campos, de acordo com a figura 8, a fim de que não houvesse a possibilidade de análise de um mesmo campo repetidas vezes (SMITH; HUNTER, 2008) (Figura 8).

Figura 8: Sequência padrão de análise dos 6 campos dos espécimes no microscópio.

Para a análise de células aderidas, foram obtidas imagens de uma série de secções horizontais de cada um dos campos selecionados com 1 μ m de intervalo (z-

step), por toda a extensão em altura do biofilme. De cada secção foram adquiridas duas imagens de forma sequencial. Para o SYTO®-9 (corante verde fluorescente) foi utilizada a excitação do laser em 488 nm, e o detector espectral foi programado para a faixa de 495 a 575 nm. Para o iodeto de propídeo (corante vermelho fluorescente), a excitação foi em 532 nm, e a detecção entre 595 e 730 nm. O programa utilizado para a o processamento das imagens digitais foi o Leica Application Suite-Advanced Fluorescence *software* (LAS AF Lite, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha) (Figura 9).

Figura 9- Processamento das imagens digitais pelo software LAS AF Lite, onde é possível observar as duas imagens sequenciais adquiridas (excitação do laser para o corante verde e para o corante vermelho) do mesmo *z-step*.

O biovolume total, a identificação da viabilidade dos microrganismos (biovolume verde e biovolume vermelho) e a porcentagem de superfície coberta em cada campo de cada espécime, foram obtidos através do *software* bioImageL v 2.0 (Dr. Luis Chavez de Paz, Malmö, Sweden) (CHAVEZ DE PAZ, 2009; GONG et al., 2013) (Figura 10 e 11). Os valores obtidos de cada grupo foram catalogados para posterior análise estatística.

Figura 10- Avaliação do campo ($275\mu\text{m}^2$ por $1\mu\text{m}$ de z-step) em imagem tridimensional quanto a seu biovolume total, biovolume verde e biovolume vermelho através do *software* bioImageL v.2.

Figura 11- Avaliação do campo ($275\mu\text{m}^2$) quanto a sua área de cobertura pelo biofilme em imagem bidimensional através do *software* bioImageL v.2.

3.4 Forma de análise dos resultados

A análise dos espécimes da Fase I avaliados através de FTIR foi realizada de forma descritiva. Já os dados numéricos catalogados da Fase II foram, inicialmente, submetidos ao teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* para a análise da distribuição dos valores. Os dados obtidos através da cultura microbiológica (UFC/mL) e da microscopia confocal (biovolume total, área de cobertura, biofilme verde e biovolume vermelho) apresentaram uma distribuição normal. Dessa forma, aplicou-se teste paramétrico ANOVA a um critério seguido de Tukey para as comparações múltiplas. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Da confirmação da deposição da camada de NPS (Fase I)

Figura 12: Espectros dos grupos CN, CP e CL sobrepostos. CN-Linha azul; CP- linha verde; CL-linha preta. Transmitância (%) no eixo vertical e número da onda (cm^{-1}) no eixo horizontal.

A figura 12 mostra a superposição dos espectros de um espécime de PMMA (CN), de um espécime de PMMA com a aplicação do primer fotopolimerizável (CP), e de um espécime que passou pelo processo sol-gel (CL). A diferença dos espectros CN e CL é claramente observada nas bandas de absorção dos grupamentos metacrilatos, onde observa-se o alargamento desses picos (Tabela 3). Os espectros apresentam a deposição da sílica pela modificação do pico de 1063 cm^{-1} e diminuição dos picos referentes aos grupos metacrilatos no espectro CL com relação ao CN e CP. Observa-se que há a diminuição da transmitância (%) do espécime CN ao espécime CL, significando que a deposição do primer e dos silicatos dificultam a visualização dos metacrilatos.

Número de onda (cm ⁻¹)	Composição
1725	carbonila do grupamento éster de metacrilatos
1274 até 965	grupamentos metacrilatos
1063	silicatos

Tabela 3: Números de onda importantes na avaliação da deposição das NPS.

4.2 Da análise e quantificação do biofilme (Fase II)

4.2.1 Análise qualitativa do biofilme

A análise descritiva do biofilme foi realizada através da avaliação das seis imagens obtidas de cada grupo pela microscopia confocal com a utilização de fluorocromos para visualização da arquitetura do seu biofilme. Foram avaliados 3 grupos: espécimes polidos mecanicamente com rugosidade média de 3 µm (PM3); espécimes polidos mecanicamente com rugosidade média de 0,3 µm (PM03); e aqueles que receberam o polimento líquido após o polimento mecânico de 3 µm (PL).

4.2.1.1 Grupo com polimento mecânico de 3 μm de rugosidade (PM3)

No grupo de espécimes com a superfície mais rugosa foi possível observar grande quantidade de células de *C. albicans* aglomeradas na forma tubular ou filamentosa, típica de hifa. Em imagens de camadas mais basais do biofilme é possível notar a presença de células na forma de levedura. Enquanto em camadas mais superficiais, observa-se a predominância de hifas e pseudo-hifas.

Figura 13: Imagens em microscopia confocal do biofilme desenvolvido na superfície dos espécimes com rugosidade média de 3 μm ; A- Imagem de fatias sobrepostas de um campo do grupo PM3; B- Imagem fotográfica de uma fatia basal do biofilme; C- Imagem fotográfica de uma fatia mais superficial do biofilme.

4.2.1.2 Grupo com polimento mecânico de 0,3 μm de rugosidade (PM03)

No grupo em que os espécimes apresentaram superfície mais lisa observou-se pouca quantidade de células de *C. albicans* aderidas ao substrato. Observou-se, também, conglomerados de células predominantemente em forma de leveduras com eventuais prolongamentos tubulares, característico de pseudo-hifas.

Figura 14: Imagens em microscopia confocal do biofilme desenvolvido na superfície dos espécimes com rugosidade média de 0,3 μm ; A- Imagem de fatias sobrepostas de um campo do grupo PM03; B- Imagem fotográfica de uma fatia basal do biofilme; C- Imagem fotográfica de uma fatia mais superficial do biofilme.

4.2.1.3 Grupo com polimento líquido (PL)

No grupo com a camada de NPS foi observada grande quantidade de células de *C. albicans* na forma de hifas e pseudo-hifas, com células na forma de levedura mais aparentes em camadas basais do biofilme.

Figura 15: Imagens em microscopia confocal do biofilme desenvolvido na superfície dos espécimes com polimento líquido; A- Imagem de cortes sobrepostos de um campo do grupo PL; B- Imagem fotográfica de um corte basal do biofilme; C- Imagem fotográfica de um corte mais superficial do biofilme.

4.2.2 Análise quantitativa do biofilme

A quantificação do biofilme foi realizada através de dois métodos: UFC/mL e microscopia confocal. As imagens obtidas através da microscopia confocal foram analisadas utilizando um *software* (BioImageL v 2.0) para calcular o volume do biofilme em μm^3 pelos cortes de 1 μm de espessura dos campos. Calculou-se, também, a área do campo (%) que foi coberta pelo biofilme. Para este cálculo a imagem utilizada foi a sobreposição de todos os cortes do biofilme de cada campo.

A tabela 4 exibe os valores médios e desvio padrão dos resultados dos três grupos testados em UFC/mL e microscopia confocal (biovolume total e área de cobertura).

Grupos	UFC/mL	Microscopia confocal	
		Biovolume Total (μm^3)	Área de cobertura (%)
PM3	$4598 \times 10^3 \pm 1825 \times 10^3^a$	77256 ± 39535^a	$29,23 \pm 11,62^a$
PM03	$472 \times 10^3 \pm 264 \times 10^3^b$	21491 ± 23168^b	$9,56 \pm 10,12^b$
PL	$3468 \times 10^3 \pm 1782 \times 10^3^a$	69453 ± 24924^a	$29,23 \pm 9,37^a$

Tabela 4: Valores médios e desvio padrão do UFC/mL, biovolume total (μm^3) e área de cobertura do substrato (%) dos três grupos testados. Letras sobrescritas iguais em cada coluna indicam que não houve diferença significativa entre os valores ($p < 0,05$).

Com base na análise dos dados, foi possível observar que a contagem de unidades formadoras de colônias do grupo de espécimes com superfícies polidas mecanicamente com 3 μm de rugosidade (PM3) não apresentou diferença estatística dos valores do grupo tratado com o polimento líquido testado (PL). Da mesma forma, os valores do biovolume total e da área do substrato coberta pelo biofilme demonstraram semelhança estatística entre os dois grupos (PM3 x PL).

No entanto, ao comparar os grupos PM3 e PL ao grupo de espécimes polidos com 0,3 μm (PM03) foi possível observar diferença estatística em todos os testes.

Tanto na contagem de unidades formadora de colônias por mililitro, quanto na avaliação do biovolume total, como no cálculo da cobertura do substrato, indicando uma colonização de *C. albicans* bem menor nos espécimes do grupo PM03.

Uma relação pode ser observada entre os resultados obtidos pelo UFC/mL e pela microscopia confocal já que os dois métodos demonstraram semelhança entre o grupo PL e o grupo PM3 e a diferença com o grupo PM03. No entanto, essa correlação não pode ser comprovada estatisticamente, pois são poucas as variáveis avaliadas para obter-se uma correlação estatisticamente significativa. Portanto, afirmar que os resultados desses dois métodos de quantificação de biofilme sejam sempre comparáveis é questionável.

Ao analisar os dados estatísticos do biovolume de células viáveis (verdes) e biovolume de células não viáveis (vermelhas) de cada grupo, observou-se que os resultados do biovolume verde foram semelhantes ao biovolume total, onde houve semelhança entre os grupos PM3 e PL e diferença entre estes e o grupo PM03. Já, quando analisados os resultados do biovolume vermelho não houve diferença estatística entre os grupos (tabela 5).

Grupos	Biovolume	
	Verde (μm^3)	Vermelho (μm^3)
PM3	76658 $\pm$ 39250 ^a	593,1 $\pm$ 314,3 ^A
PM03	20974 $\pm$ 22844 ^b	514,4 $\pm$ 590,2 ^A
PL	68367 $\pm$ 24399 ^a	1081 $\pm$ 796,1 ^A

Tabela 5: Valores médios e desvio padrão dos resultados de biovolume verde e biovolume vermelho dos três grupos testados. Letras sobrescritas iguais em cada coluna indicam que não houve diferença significativa entre os valores ($p < 0,05$).

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

A modificação da superfície de materiais para base de próteses com a finalidade de diminuir a adesão de biofilme é um assunto muito estudado atualmente (PARK et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; COCHIS et al., 2012; LAZARIN et al., 2013). Esta atenção é dada, principalmente, devido às altas taxas de estomatite protética em pacientes usuários de próteses totais e pelas previsões de aumento dessa taxa em populações de muitos países (GENDREAU; LOEWY, 2011). Assim, diversos produtos com a finalidade de revestir a resina acrílica e modificar suas propriedades vêm sendo desenvolvidos (YILDIRIM et al., 2005; PARK et al., 2008; ARAI et al., 2009; REDDING et al., 2009; ZHOU et al., 2010; TÁVORA, 2011; ZAMPERINI et al., 2011; COCHIS et al., 2012).

Com este fim, o processo sol-gel se mostra de grande valia para a confecção de revestimentos de materiais na odontologia e medicina, já que é capaz de produzir um revestimento de fácil obtenção, baixo custo, resistentes a diversos agressores e com propriedades de superfície diversas (CORADIN; BOISSIERE; LIVAGE, 2006; CHIRIAC et al., 2010).

5.1 Da metodologia

Historicamente, o revestimento cerâmico de materiais orgânicos não era possível devido ao processamento da sílica ser através de temperaturas extremamente altas (CORADIN; BOISSIERE; LIVAGE, 2006). No entanto, com a tecnologia sol-gel este revestimento tornou-se possível, já que a deposição de sílica é obtida sem aumentos significativos da temperatura.

A técnica de molhamento tradicional do processo sol-gel preconiza a secagem a 100° C do gel após a imersão na dispersão (sol) (BRINKER et al., 1991). Já no método desenvolvido pela empresa VIPI não há a necessidade desta etapa posterior. Pela modificação da técnica, foi indispensável a avaliação da presença do revestimento da resina acrílica por dióxido de silício.

Os grupos utilizados para o experimento de FTIR foram resinas acrílicas que não receberam qualquer tratamento em sua superfície (CN), espécimes que

receberam apenas a aplicação do primer (CP), e aqueles que receberam a aplicação do primer e passaram pelo processo sol-gel (CL). Esses grupos foram escolhidos para verificar se houve diferença no espectro de Transmitância entre o grupo CL e os grupos CP e CN, indicando assim, uma real deposição da sílica e não apenas uma interferência do primer no espectro.

Já na segunda fase, os grupos avaliados para testar a efetividade do polimento líquido, foram aqueles com uma maior rugosidade (PM3), e aqueles mais polidos (PM03), conferindo ao estudo dois grupos controles. Isto se justifica já que, na literatura, superfícies mais rugosas apresentam uma maior colonização por microrganismos do que superfícies mais polidas (RADFORD et al., 1998; RAMAGE et al., 2004; NEVZATOGLU et al., 2007; PEREIRA-CENCI et al., 2007; DA SILVA et al., 2010). Segundo Pereira-Cenci et al. (2008), isso ocorre porque a topografia de uma resina acrílica, repleta de sulcos e ranhuras resultantes das etapas de acabamento e polimento, oferece proteção aos microrganismos contra as forças de cisalhamento e limpeza mecânica.

Para a quantificação do biofilme de *C. albicans*, foram utilizados dois métodos, o UFC/mL e a microscopia confocal. O UFC/mL é um método que quantifica as células viáveis do biofilme. Já a microscopia confocal, com o auxílio de *softwares*, pode analisar diversos aspectos do biofilme como o biovolume total, biovolume viável e não viável (CHAVEZ DE PAZ, 2009; TÁVORA, 2011; NING et al., 2013). No entanto, uma diferença entre as duas técnicas durante a avaliação de biofilme é que a microscopia confocal utiliza-se apenas de campos específicos do biofilme, enquanto o UFC/mL avalia o biofilme como um todo.

Neste estudo, então, elegeu-se a associação dos dois métodos como a melhor forma de avaliação do biofilme de *C. albicans*. A opção por utilizar estas técnicas ocorreu pela possibilidade de se verificar um biofilme intacto quando se emprega a microscopia confocal. Enquanto, o método UFC/mL apresenta a vantagem de quantificar o biofilme como um todo, já que este não possui uma estrutura homogênea (CHANDRA et al., 2001a; RAMAGE et al., 2001; CHANDRA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2008; SILVA et al., 2010; ESTIVILL et al., 2011).

5.2 Dos resultados

Os resultados da espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) demonstraram a deposição satisfatória dos silicatos, indicando que houve o revestimento do PMMA pela camada cerâmica. Em face à confirmação da deposição, permitiu-se o avanço nos experimentos para a avaliação e quantificação do biofilme de *C. albicans* (Fase II) nessas superfícies.

A avaliação da arquitetura dos biofilmes, neste trabalho, demonstrou o que já está consolidado na literatura sobre um biofilme de *C. albicans* desenvolvido em superfícies abióticas. O biofilme apresentou uma camada basal composta de células em forma de levedura e hifas conferindo-lhe o crescimento vertical (BAILLIE; DOUGLAS, 1999; CHANDRA et al., 2001a; RAMAGE et al., 2001; RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006; GANGULY; MITCHELL, 2011).

Os espécimes com revestimento de nanopartículas de dióxido de silício (PL) e superfícies mais rugosas (PM3) apresentaram o biofilme mais denso e com uma maior quantidade de hifas. Enquanto as amostras com a superfície mais polida (PM03) exibiram um crescimento mais contido com maior número de leveduras e pseudo-hifas. Da mesma forma, os resultados dos testes quantitativos do biofilme, UFC/mL, biovolume total e área de cobertura, mostraram semelhança estatística entre os grupos PL e PM3 e diferença quando comparados ao grupo de menor rugosidade, PM03.

Os resultados de adesão de biofilme de *C. albicans* para o grupo PL não foram os esperados, já que há relatos na literatura de diminuição de colonização de superfícies quando revestidas com nanopartículas de sílica (LORD et al., 2006; COUSINS et al., 2007; ALLAKER, 2010; AZUMA; AKIBA; MINAKUCHI, 2012; BOTEQUIM et al., 2012). Em seu estudo, Azuma, Akiba e Minakuchi (2012) verificaram a diminuição da rugosidade e da hidrofobicidade nas superfícies tratadas com NPS. No entanto, este estudo diferiu do nosso pela aplicação do primer. Dessa forma, uma possibilidade para justificar a divergência de resultados é a presença de uma camada não polimerizada do primer pelo contato com o oxigênio (SAYINSU et al., 2007). Conjectura-se, também, que pode ter havido a modificação da

hidrofobicidade da superfície das NPS, já que sua hidrofília intrínseca pode ser alterada pela adsorção de proteínas (KANTA; SEDEV; RALSTON, 2005).

No entanto, como não foi o objetivo desse estudo, tais propriedades como a rugosidade, a hidrofobicidade e a energia livre da superfície dos grupos PL não foram avaliadas e não foi possível precisar qual característica pode ter contribuído para este resultado (LI; YAN; XU, 2003; PATEL et al., 2003; RAMAGE et al., 2004; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007; DA SILVA et al., 2010; SARDI et al., 2013).

O UFC/mL e o biovolume verde são dois métodos que avaliam a mesma variável: células viáveis. Contudo, o UFC/mL utiliza-se do biofilme como um todo, e o biovolume verde, por ser obtido através da microscopia confocal, considera apenas campos específicos do biofilme. Os resultados obtidos através dos dois métodos apresentaram uma relação direta entre si, já que os dois indicaram uma semelhança na quantidade de colonização dos espécimes PM3 e PL e diferença entre estes e o grupo PM03. Desta forma, pode-se afirmar que, neste estudo, os seis campos obtidos em cada espécime para avaliação em microscopia confocal foram representativos do biofilme.

Esta relação pode ser observada, também, entre o UFC/mL e o biovolume total. Isso ocorre devido ao biovolume total ser composto quantitativamente pelo biovolume verde e biovolume vermelho. E como não foi testado nenhum método antifúngico, o biovolume vermelho não demonstrou diferença entre os grupos. Dessa forma, a variação no biovolume verde, e sua relação com o UFC/mL, se espelhou diretamente nos valores do biovolume total.

Os resultados do biovolume total e da área de cobertura, também demonstraram relação direta. Todavia, se a diferença entre os grupos PL e PM3 e o grupo PM03 não fosse tão evidente, provavelmente, esta relação não estivesse presente. Isso se justifica, porque o biovolume total considera o biofilme de *Candida* em três eixos (x, y e z) formando uma imagem tridimensional, enquanto a área de cobertura é um valor bidimensional onde são considerados apenas dois eixos (x e y), ou seja, todas as imagens do biovolume total sobrepostas. Portanto, o percentual da área coberta pelo biofilme, muitas vezes não é compatível com o biovolume total que além de avaliar a área do biofilme, também considera a altura do mesmo. Portanto, um biofilme que ocupa grande parte da área de um campo, mas não

possui um crescimento vertical pode ter valores maiores de área de cobertura do que um biofilme que ocupa um espaço menor da área, mas tem um crescimento significativo em altura.

Por esta razão, um método de microscopia que não avalia a estrutura tridimensional do biofilme não seria adequado para sua quantificação. Entretanto, no presente estudo, os resultados da quantificação do biofilme nas imagens tridimensionais e bidimensionais apresentaram uma relação direta entre si.

Neste estudo, observou-se que o polimento líquido experimental não foi efetivo na diminuição da colonização da superfície por biofilme de *C. albicans*. Entretanto, a facilidade de modificação das características de superfície de um material pelo processo sol-gel faz deste polimento líquido um produto promissor, já que, as superfícies com propriedades controladas são, há muito, almejadas com a finalidade de conter a contaminação (BLOSSEY, 2003).

Ademais, por ser um produto de fácil obtenção e desenvolvido por uma empresa brasileira pode diminuir o custo e chegar mais facilmente ao mercado consumidor. Por esta razão, devem-se concentrar esforços para avaliar quais características a serem modificadas, novamente testar sua efetividade quanto à contaminação microbiana e posteriormente, avaliar as características físicas do material, como longevidade da camada e resistência a agressores químicos e físicos.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia e limitações inerentes a um estudo *in vitro* pode-se concluir que:

- A análise por FTIR demonstrou que o produto experimental permitiu a confecção da camada de nanopartículas de dióxido de silício.

- A análise de quantificação do biofilme de *C. albicans* por UFC/mL e microscopia confocal demonstrou que a camada de dióxido de silício não foi efetiva na diminuição da colonização de biofilme de *C. albicans* em resina acrílica para base de próteses.

Referências

REFERÊNCIAS

Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *Journal of dental research*. 2010 Nov;89(11):1175-86.

Arai T, Ueda T, Sugiyama T, Sakurai K. Inhibiting microbial adhesion to denture base acrylic resin by titanium dioxide coating. *Journal of oral rehabilitation*. 2009 Dec;36(12):902-8.

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *Journal of oral rehabilitation*. 1987 May;14(3):217-27.

Azuma A, Akiba N, Minakuchi S. Hydrophilic surface modification of acrylic denture base material by silica coating and its influence on *Candida albicans* adherence. *J Med Dent Sci*. 2012 59(1 – 7.

Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of medical microbiology*. 1999 Jul;48(7):671-9.

Baran I, Nalcaci R. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2009 Sep-Oct;49(2):237-41.

Ben-Nissan B, Choi AH. Sol-gel production of bioactive nanocoatings for medical applications. Part 1: an introduction. *Nanomedicine*. 2006 1(3):311-9.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS yeast research*. 2008 May;8(3):442-50.

Blossey R. Self-cleaning surfaces--virtual realities. *Nature materials*. 2003 May;2(5):301-6.

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. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 1997 Jul;13(4):258-69.

Botequim D, Maia J, Lino MM, Lopes LM, Simoes PN, Ilharco LM, et al. Nanoparticles and surfaces presenting antifungal, antibacterial and antiviral properties. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2012 May 22;28(20):7646-56.

Brinker CJ, Frye GC, Hurd AJ, Ashley CS. Fundamentals of Sol-Gel Dip Coating. *Thin Solid Films*. 1991 Jun 5;201(1):97-108.

- Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scandinavian journal of dental research*. 1974 82(2):151-90.
- Budtz-Jorgensen E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *J Am Dent Assoc*. 1978 Mar;96(3):474-9.
- Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta odontologica Scandinavica*. 1970 Mar;28(1):71-92.
- Budtz-Jorgensen E, Kaaber S. Clinical effects of glazing denture acrylic resin bases using an ultraviolet curing method. *Scandinavian journal of dental research*. 1986 Dec;94(6):569-74.
- Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1975 May;3(3):115-9.
- Burgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta biomaterialia*. 2010 Jun;6(6):2307-13.
- Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral microbiology and immunology*. 2008 Oct;23(5):419-24.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*. 2001a Sep;183(18):5385-94.
- Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nature protocols*. 2008 3(12):1909-24.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *Journal of dental research*. 2001b Mar;80(3):903-8.
- Chavez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 2009 Mar;75(6):1734-9.
- Chiriac AP, Neamtu I, Nita LE, Nistor MT. Sol gel method performed for biomedical products implementation. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2010 Oct;10(11):990-1013.
- Cochis A, Fracchia L, Martinotti MG, Rimondini L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic

devices. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology. 2012 Jun;113(6):755-61.

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. Oral microbiology and immunology. 2008 Oct;23(5):377-83.

Coradin T, Boissiere M, Livage J. Sol-gel chemistry in medicinal science. Current medicinal chemistry. 2006 13(1):99-108.

Cousins BG, Allison HE, Doherty PJ, Edwards C, Garvey MJ, Martin DS, et al. Effects of a nanoparticulate silica substrate on cell attachment of *Candida albicans*. Journal of applied microbiology. 2007 Mar;102(3):757-65.

Cuellar-Cruz M, Vega-Gonzalez A, Mendoza-Novelo B, Lopez-Romero E, Ruiz-Baca E, Quintanar-Escorza MA, et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2012 Oct;31(10):2513-27.

da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. Mycoses. 2011 Nov;54(6):e712-7.

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. Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials. 2010 Jul;94(1):149-56.

de Oliveira CE, Gasparoto TH, Dionisio TJ, Porto VC, Vieira NA, Santos CF, et al. *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. The International journal of prosthodontics. 2010 Mar-Apr;23(2):158-9.

Dikbas I, Koksall T, Calikkocaoglu S. Investigation of the cleanliness of dentures in a university hospital. The International journal of prosthodontics. 2006 May-Jun;19(3):294-8.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. Journal of dentistry. 2005 Mar;33(3):223-33.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. PLoS One. 2009 4(11):e7967.

Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001 Oct 15;33(8):1387-92.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93.

Douglass CW, Shih A, Ostry L. Will there be a need for complete dentures in the United States in 2020? *The Journal of prosthetic dentistry*. 2002 Jan;87(1):5-8.

Emami E, de Grandmont P, Rompre PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *Journal of dental research*. 2008 May;87(5):440-4.

Emami E, Seguin J, Rompre PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. *The International journal of prosthodontics*. 2007 Sep-Oct;20(5):514-20.

Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2003 Nov;32(10):571-5.

Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Munoz AJ, Arevalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of microbiological methods*. 2011 Aug;86(2):238-42.

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Feb;9(2):109-18.

Fonesca FA, Jones KM, Mendes DC, Dos Santos Neto PE, Ferreira RC, Pordeus IA, et al. The oral health of seniors in Brazil: addressing the consequences of a historic lack of public health dentistry in an unequal society. *Gerodontology*. 2013 Mar 14;

Frade JP, Arthington-Skaggs BA. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. *Mycoses*. 2011 Jul;54(4):e154-62.

Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira EFE. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *Journal of oral rehabilitation*. 2008 May;35(5):370-4.

Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*. 2011 Aug;14(4):380-5.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists*. 2011 Jun;20(4):251-60.

Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Molecular & general genetics : MGG*. 1984 198(1):179-82.

Gong SQ, Epasinghe DJ, Zhou B, Niu LN, Kimmerling KA, Rueggeberg FA, et al. Effect of water-aging on the antimicrobial activities of an ORMOSIL-containing orthodontic acrylic resin. *Acta biomaterialia*. 2013 Feb 26;

Hahnel S, Ettl T, Gosau M, Rosentritt M, Handel G, Burgers R. Influence of saliva substitute films on the initial adhesion of *Candida albicans* to dental substrata prior to and after artificial ageing. *Archives of oral biology*. 2010 May;55(5):391-6.

Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Burgers R. Influence of saliva substitute films on initial *Streptococcus mutans* adhesion to enamel and dental substrata. *Journal of dentistry*. 2008 Dec;36(12):977-83.

Hannig M, Kriener L, Hoth-Hannig W, Becker-Willinger C, Schmidt H. Influence of nanocomposite surface coating on biofilm formation in situ. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2007 Dec;7(12):4642-8.

Jacobina M. Formação do biofilme de *Candida albicans* na superfície de uma resina acrílica termopolimerizável tratada com polimento líquido [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru 2012.

Jagger DC, Al-Akhazam L, Harrison A, Rees JS. The effectiveness of seven denture cleansers on tea stain removal from PMMA acrylic resin. *The International journal of prosthodontics*. 2002 Nov-Dec;15(6):549-52.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2005 Apr;159(3):353-60.

Kang SH, Lee HJ, Hong SH, Kim KH, Kwon TY. Influence of surface characteristics on the adhesion of *Candida albicans* to various denture lining materials. *Acta odontologica Scandinavica*. 2013 Jan;71(1):241-8.

Kanta A, Sedev R, Ralston J. Thermally- and photoinduced changes in the water wettability of low-surface-area silica and titania. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2005 Mar 15;21(6):2400-7.

Kovac-Kovacic M, Skaleric U. The prevalence of oral mucosal lesions in a population in Ljubljana, Slovenia. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the*

International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2000 Aug;29(7):331-5.

Kruppa M, Krom BP, Chauhan N, Bambach AV, Cihlar RL, Calderone RA. The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2004 Aug;3(4):1062-5.

Kucharikova S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdakova H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *Journal of medical microbiology*. 2011 Sep;60(Pt 9):1261-9.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity*. 2002 Feb;70(2):878-88.

Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *Journal of oral rehabilitation*. 2002 Mar;29(3):300-4.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Current opinion in microbiology*. 2002 Dec;5(6):608-11.

Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DM, Vergani CE. Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. *Archives of oral biology*. 2013 Jan;58(1):1-9.

Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2003 Feb;149(Pt 2):353-62.

Lord MS, Cousins BG, Doherty PJ, Whitelock JM, Simmons A, Williams RL, et al. The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(28):4856-62.

Luhrs AK, Geurtsen W. The application of silicon and silicates in dentistry: a review. *Progress in molecular and subcellular biology*. 2009 47(359-80).

Marchini L, Vieira PC, Bossan TP, Montenegro FL, Cunha VP. Self-reported oral hygiene habits among institutionalised elderly and their relationship to the condition of oral tissues in Taubate, Brazil. *Gerodontology*. 2006 Mar;23(1):33-7.

Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Archives of oral biology*. 2009 Feb;54(2):127-31.

Martinez LR, Fries BC. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Curr Fungal Infect Rep*. 2010 Dec 1;4(4):266-75.

Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside relining resin. *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists*. 2008 Jun;17(4):312-7.

Monsenego P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study 'in vivo'. *Journal of oral rehabilitation*. 2000 Aug;27(8):708-13.

Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International journal of antimicrobial agents*. 2009 Aug;34(2):103-10.

Morgan TD, Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *Journal of applied microbiology*. 2001 Jul;91(1):47-53.

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. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2006 Sep;96(3):205-11.

Mumcu G, Cimilli H, Sur H, Hayran O, Atalay T. Prevalence and distribution of oral lesions: a cross-sectional study in Turkey. *Oral diseases*. 2005 Mar;11(2):81-7.

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. *Clinical oral investigations*. 2007 Sep;11(3):231-6.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. *Journal of dentistry*. 1998 May;26(4):299-304.

Ning Y, Hu X, Ling J, Du Y, Liu J, Liu H, et al. *Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions. *International endodontic journal*. 2013 Jan;46(1):62-70.

Odds FC. *Candida* infections: an overview. *Crit Rev Microbiol*. 1987 15(1):1-5.

Odds FC. Mycology in oral pathology. *Acta stomatologica Belgica*. 1997 Jun;94(2):75-80.

Park SE, Blissett R, Susarla SM, Weber HP. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists*. 2008 Jul;17(5):365-9.

Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists*. 2003 Dec;12(4):249-54.

Patel JD, Ebert M, Stokes K, Ward R, Anderson JM. Inhibition of bacterial and leukocyte adhesion under shear stress conditions by material surface chemistry. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2003 14(3):279-95.

Peltola P, Vehkalahti MM, Wuolijoki-Saaristo K. Oral health and treatment needs of the long-term hospitalised elderly. *Gerodontology*. 2004 Jun;21(2):93-9.

Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *The International journal of prosthodontics*. 2007 May-Jun;20(3):308-10.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2008 Mar-Apr;16(2):86-94.

Pinto LdR. Efeito da desinfecção química sobre a microdureza e rugosidade superficial de resinas para base de dentaduras e resinas rígidas para reembasamento. Estudo longitudinal. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *Journal of oral rehabilitation*. 2002 Nov;29(11):1115-9.

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. *Journal of clinical periodontology*. 1990 Mar;17(3):138-44.

Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *Journal of dentistry*. 1998 Sep;26(7):577-83.

Ramage G, Lopez-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods Mol Med*. 2005 118(71-9).

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS yeast research*. 2006 Nov;6(7):979-86.

- Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2004 Jul;98(1):53-9.
- Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micologia*. 2001 Dec;18(4):163-70.
- Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009 May;107(5):669-72.
- Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1992 Feb;73(2):171-80.
- Sandven P. Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol*. 2000 Sep;17(3):73-81.
- Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*. 2013 Jan;62(Pt 1):10-24.
- Sartori EA, Schmidt CB, Walber LF, Shinkai RS. Effect of microwave disinfection on denture base adaptation and resin surface roughness. *Brazilian dental journal*. 2006 17(3):195-200.
- Sayinsu K, Isik F, Sezen S, Aydemir B. Effect of blood and saliva contamination on bond strength of brackets bonded with a protective liquid polish and a light-cured adhesive. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2007 Mar;131(3):391-4.
- Sesma N, Lagana DC, Morimoto S, Gil C. Effect of denture surface glazing on denture plaque formation. *Brazilian dental journal*. 2005 16(2):129-34.
- Shulman JD, Beach MM, Rivera-Hidalgo F. The prevalence of oral mucosal lesions in U.S. adults: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Am Dent Assoc*. 2004 Sep;135(9):1279-86.
- Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2005 Jul;34(6):340-6.
- Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *The International journal of prosthodontics*. 2006 May-Jun;19(3):288-93.

Silva PMBD. Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilmes de *C. albicans* em resinas acrílicas termopolimerizáveis. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2009.

Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Current microbiology*. 2010 Dec;61(6):534-40.

Singh R, Shivaprakash MR, Chakrabarti A. Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiology*. 2011 Sep;157(Pt 9):2611-8.

Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *Journal of dentistry*. 2001 Mar;29(3):197-204.

Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of medical microbiology*. 2008 Aug;57(Pt 8):966-73.

Távora FFF. Efeito do etil-cianocrilato (Super Bonder [R]) e do polidor líquido de baixa viscosidade (Biscover [R]) sobre biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica para reembasamento [Doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de bauru; 2011.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical oral implants research*. 2006 Oct;17 Suppl 2(68-81).

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of oral biology*. 2007 Aug;52(8):761-7.

Thiele MC, Carvalho Ade P, Gursky LC, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. The role of candidal histolytic enzymes on denture-induced stomatitis in patients living in retirement homes. *Gerodontology*. 2008 Dec;25(4):229-36.

Triantos D. Intra-oral findings and general health conditions among institutionalized and non-institutionalized elderly in Greece. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2005 Nov;34(10):577-82.

Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *Journal of dentistry*. 2013 Feb 28;

von Fraunhofer JA, Loewy ZG. Factors involved in microbial colonization of oral prostheses. *General dentistry*. 2009 Mar-Apr;57(2):136-43; quiz 44-5.

- Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. Australian dental journal. 1998 Feb;43(1):45-50.
- Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of Candida albicans to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. Journal of oral rehabilitation. 2005 Jul;32(7):518-25.
- Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal Candida. Mycoses. 2010 May;53(3):221-6.
- Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. Mycoses. 2011 Sep;54(5):e344-51.
- Zhou L, Tong Z, Wu G, Feng Z, Bai S, Dong Y, et al. Parylene coating hinders Candida albicans adhesion to silicone elastomers and denture bases resin. Archives of oral biology. 2010 Jun;55(6):401-9.