UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANA PAULA CHAPPUIS CHOCANO

**Modificação das propriedades superficiais dos polímeros sintéticos
e orgânicos após imersão em biofilme de *C.albicans***

**BAURU
2017**

ANA PAULA CHAPPUIS CHOCANO

Modificação das propriedades superficiais dos polímeros sintéticos e orgânicos após imersão em biofilme de *C.albicans*

Modification of the surface properties of two synthetic organic polymers after immersion in *C. albicans* biofilm

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

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

**BAURU
2017**

Chocano, Ana Paula Chappuis

C369m Modificação das propriedades superficiais dos
polímeros sintéticos e orgânicos após imersão em
biofilme de *C.albicans* / Ana Paula Chappuis
Chocano. – Bauru, 2017.

.
88 p. : il. ; 31cm.

Dissertação de 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/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

***A Deus**, meu pai, por iluminar meu caminho, seu amor e sua companhia me dá coragem e perseverança para continuar e enfrentar as dificuldades que se apresentam no caminho. Obrigada, pelas bênçãos, por ter me dado forças e saúde para atingir meus objetivos. Amo você!*

DEDICATÓRIA

A minha família: Ana María Chocano (Mãe) e Francezca Chappuis (irmã)

Mãe: Obrigada por seu apoio durante todo este tempo. Obrigada pela paciência, pelo amor e por suportar a distância entre nós. Sei que foram anos difíceis para você, sentindo a minha falta todos os dias, mas pronto estaremos juntas de novo. Amo você!

Irmã: Sei que a distância também foi difícil para você, mas tenha a certeza que o tempo não vai fazer com que o nosso relacionamento se deteriore. Sempre tenho presente você nas minhas orações e sempre vou estar nos momentos mais difíceis, para te ajudar e te orientar quando precisar. Amo a sua vida!!

AGRADECIMENTOS

Meu namorado: **Heitor**, obrigada pelo seu amor, apoio e companhia durante todo este tempo. Você é uma das pessoas mais importantes e especiais da minha vida. Sou muito grata a Deus por ter trazido você a minha vida. Amo você!

Aos meus avós: **Yolanda e Eugenio**, obrigada pelo apoio, por sempre manter a nossa família unida, especialmente nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor e por desejar sempre o melhor para mim. Que Deus os guarde e abençoe sempre seus caminhos no nome de Jesus! Amo vocês!

Ao meu tio: **Juan**, obrigada por cuidar da família e pela atenção com os meus avós. Que Deus te oriente e guie seus caminhos sempre!

Aos meus queridos tios **Marita e Miguel**, por sempre me apoiar nas minhas decisões e pela motivação de sair sempre para frente. Obrigada pelo seu amor e cuidado.

A minha família inteira: **pai, avó, tios, primos, primas**. Obrigada por sempre me apoiar nas minhas decisões, por seu carinho e bons desejos.

Às minhas amigas do Perú, **Lizeth e Alexandra**. Obrigada pela amizade e pelo carinho que demonstraram durante todo este tempo. Pronto estarei com vocês compartilhando o aprendizado e curtindo momentos juntas.

Às minhas irmãzinhas de Bauru, **Fabiola e Mariciel**. Sou muito grata a Deus pelas suas vidas e por ter me colocado perto de vocês. Obrigada pela companhia, amizade e motivação que sempre me deram. Uma das coisas mais lindas de estar aqui foi conhecer vocês. Sempre estarei quando precisarem!

A minha querida **Igreja Cristã Renovada: os meus pastores, líderes e toda nossa comunidade**. A minha vida mudou literalmente quando pisei esse lugar e conheci todos vocês. Não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim. Obrigada pelo aprendizado, os cuidados, as orações e o amor que sempre me fizeram sentir. Que Deus faça com que mais pessoas possam conhecer vocês! Vocês são demais!

Aos meus amigos de curso de Mestrado, **Dyna, Cristiane, Jessica, Leadiane, Camila, Samira, Cindy e Ernesto**, pela troca de conhecimentos, experiência, convívio e amizade. Tenho certeza que todo o sacrifício que colocaram durante este tempo será refletido. Sucesso para todos vocês!

Aos meus amigos especiais que fiz em Bauru, **Dani, Natalia, Onaeli, Reyna, Roxana, Vanessa, Camila, Mariane e Renán**, obrigada por fazerem parte da minha vida aqui em Bauru. Com vocês compartilhei meus momentos mais especiais!

Ao pessoal do CIP:

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso, de Oliveira por ter facilitado as instalações e desenvolvimento deste trabalho.

Rafaela, Marcelo e Marcia. Muito obrigada pela paciência e pela disposição que sempre tiveram para me ajudar com o desenvolvimento deste projeto.

Ao professor **Paulo Noronha** do Departamento de Física da faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista (UNESP) no Campus de Bauru, meus sinceros agradecimentos pela gentileza em nos ceder a utilização dos equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor **Miguel Jafellici** do Departamento de Físico Química do Instituto de Química de Araraquara – Unesp, por auxiliar e permitir a execução da molhabilidade de superfície no Goniômetro que fica no laboratório pelo qual é o professor responsável.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto**, obrigada por ter confiado em mim e por me auxiliar durante todo este tempo. Desde o começo você me motivo e incentivo para fazer este curso e não tenho palavras para agradecer tudo aquilo. Todas as dúvidas, conversas e dificuldades que se apresentaram no caminho me fizeram crescer não só como cirurgiã-dentista, mas também como pessoa. Você é um exemplo de professor apaixonado pelo que faz!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese** que exerceu a sua função durante o curso de Mestrado, com dedicação, responsabilidade e seriedade, apoiando a realização de todos os trabalhos.

Aos professores do Departamento de Prótese: **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, Prof. Dr. Accacio Lins do Vale, Profa. Dra. Ana Lucía Pompéia Frada de Almeida, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Prof. Dr. Carlos Araujo, Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, Prof. Dr. Pedro Garcia de Oliveira, Prof. Dr. Renato de Freitas, Profa. Dra. Simone Soares, Prof. Dr. Wellington Bonachela**, por todos os ensinamentos transmitidos e pela contribuição no meu aprendizado. São exemplos, de dedicação, perseverança e competência.

Agradeço com muito carinho,

Aos meus colegas que formam parte do grupo de Pesquisa do Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto: **Denise, Oscar e Rodrigo**, pela amizade, dedicação, ajuda e entrega que sempre demonstraram na execução dos projetos, assim como na elaboração de artigos científicos.

Aos funcionários do departamento de Prótese: **Débora, Cleide, Marcelo, Reivanildo e Valquíria**, pela cooperação, disposição e gentileza para a execução dos nossos trabalhos. Muito obrigada.

Às funcionárias da Clínica da Pós-graduação: **Cleusa e Hebe**, meus agradecimentos pela receptividade, amizade, cooperação e disponibilidade para realizar os nossos atendimentos da melhor forma.

Às funcionárias da Clínica da Pós-graduação: **Cleusa e Hebe**, meus agradecimentos pela receptividade, amizade, cooperação e disponibilidade para realizar os nossos atendimentos da melhor forma.

Aos funcionários da Biblioteca, **Valéria, Rita, Vera, Cybelle, César e Ademir**, pela disponibilidade de sempre.

A todos os funcionários muito obrigada!!

Agradeço com muito carinho,

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na
pessoa da diretora Profa. **Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, e
do vice-diretor **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**

À **CAPES** pela concessão da bolsa de Mestrado.

À **FAPESP** pela concessão do Auxílio para o desenvolvimento do meu
trabalho. Processo 2014/09426-3.

Ao **Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Jr.**, diretor do C.E.V.A.P., pela doação do
adesivo tissular à base de veneno de cobra.

RESUMO

Modificação das propriedades superficiais dos polímeros sintéticos e orgânicos após imersão em biofilme de *C.albicans*

A proposta deste trabalho foi avaliar as alterações da rugosidade e hidrofobicidade superficial de 4 adesivos sintéticos e 1 orgânico aplicados em resinas acrílicas termopolimerizáveis (RAT) antes e após 7, 14 e 30 dias de serem submetidos em biofilme de *Cândida albicans*. Foram confeccionados cento e oito espécimes de resina acrílica termopolimerizável (10x10x3mm) na qual foram aplicados 4 adesivos sintéticos a base de CAs: Etil cianoacrilato convencional (ECAc - Superbond®), Etil cianoacrilato em gel (ECAg – Superbond® em gel), Butil cianoacrilato (BCA – Tekbond®), Octil cianoacrilato (OCA – Dermabond®) e 1 adesivo orgânico a base de veneno de cobra (AT- C.E.V.A.P, Unesp). Após da polimerização dos produtos aplicados, foram aguardados 48 horas para a leitura da rugosidade no perfilômetro e da hidrofobicidade no goniômetro, concluído este procedimento todos os espécimes passaram por um processo de esterilização por óxido de etileno para logo serem divididos em 3 grupos: 7, 14 e 30 dias. Seguidamente os espécimes foram inoculados com *Cândida albicans* SC5314 (1.107 células/mL) para a formação de biofilme. Concluído os períodos de avaliação, foi selecionado 1 espécime de cada grupo para ser corado através dos fluorocromos SYTO-9 e iodeto de propídeo para análise em microscópio confocal e simultaneamente os demais espécimes passaram pela remoção mecânica do biofilme, para logo serem lavados e secados a temperatura ambiente sobre exposição de luz UV durante 6 horas. Em seguida os espécimes foram envalados e esterilizados por óxido de etileno para finalmente ser avaliados no perfilômetro e goniômetro. Para a avaliação das medidas iniciais dos materiais testados foi empregado o teste de anova 1 critério e para a análise após da imersão em biofilme de *Cândida albicans* foi utilizado o teste de anova 2 critérios. Para as diferenças encontradas entre os grupos, foi utilizado o teste de comparação múltipla (Teste de Tukey). Foi adotado um nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que todos os grupos CAs conseguiram diminuir significativamente a rugosidade superficial, além de manter propriedades hidrofóbicas na sua superfície: ECAc (2,02 μm - 86.93°), ECAg (2.57 μm -109.06°), BCA (0.78 μm – 95.57°), OCA (0.61 μm -102.47°), porém o AT tornou a superfície da resina acrílica hidrofílica, além de não conseguir diminuir a rugosidade da RAT

($3.63\mu\text{m} - 59.49^\circ$). Após imersão em biofilme microbiano, foi constatado que o biofilme de *C. albicans* conseguiu diminuir significativamente os valores da rugosidade em todos os períodos avaliados, exceto o grupo BCA. Com relação a hidrofobicidade foi observada uma redução significativa dos valores hidrofóbicos em todos os grupos testados após imersão em biofilme de *C.albicans*, exceto no grupo AT nos 3 períodos avaliados. Estes resultados confirmaram que os grupos CAs melhoram as características físico-químicas das RATs, destacando-se dentre eles o grupo OCA com superfícies menos rugosas e propriedades hidrofóbicas na sua superfície. Por outro lado, cabe salientar o grupo BCA cuja rugosidade foi inalterada. Finalmente as imagens em microscópio confocal revelaram que os grupos etil cianoacrilatos apresentam uma maior efetividade em inibir a adesão microbiana.

Palavras chaves: Prótese total. *Cândida albicans*. Adesivos. Adesivos tissulares.

ABSTRACT

Modification of the surface properties of two synthetic organic polymers after immersion in *C. albicans* biofilm

The objective of this study was to analyze the effect of synthetic and organic adhesives on the surface roughness and surface hydrophobicity of heat-polymerized acrylic resin before and after 7, 14 and 30 days of being submitted to the biofilm of *C. albicans*. One hundred and eight specimens of heat-polymerized acrylic resin were fabricated (10x10x3mm) for them apply on its surface 4 adhesives based on cyanoacrylate (CA): ethyl cyanoacrylate conventional (ECAc – Superbonder®), ethyl cyanoacrylate gel (ECAg – Superbonder® gel), butyl cyanoacrylate (BCA – Tekbond®), octil cyanoacrylate (OCA-Dermabond®) and one fibrin sealant derived from Snake-venom (AT – C.E.V.A.P, Unesp). After the polymerization of the applied products, 48 hours were expected for the roughness reading in the profilometer and the hydrophobicity in the goniometer. Following this procedure, all specimens underwent sterilization process by ethylene oxide to divide them into 3 groups: 7, 14 and 30 days. Afterward specimens were inoculated with *C. albicans* SC5314 (1.10^7 cells/mL) for biofilm formation. After evaluation periods, the remaining biofilme of one specimen from each group were stained with fluorochromes SYTO-9 and propidium iodide to be analyzed by confocal microscopy (MC) and simultaneously others specimens were mechanically biofilm removed, washed, and dried room temperature on UV light exposure for 6 hours. Then specimens were embossed and sterilized by ethylene oxide to finally be analyzed in profilometer and goniometer. The data were statistically analyzed using one-way anova for initial measurements and two-way anova test for analysis after immersion in *Candida albicans* biofilm. For differences found between groups, the multiple comparison test (tukey test) was used, considering a significance level of 5%. Results showed that all CAs were able to reduce surface roughness and maintain hydrophobic properties on the surface: ECAc (2,02 μm - 86.93°), ECAg (2.57 μm -109.06°), BCA(0.78 μm – 95.57°), OCA (0.61 μm -102.47°), however the AT group changes the acrylic resin surface hydrophilic, as well as not being able to reduce the surface roughness of the RAT (3.63 μm – 59.49°). Subsequent immersion in microbial biofilms, it was verified that *Candida albicans* biofilm was able to reduce roughness values in all groups, except the BCA group. Regarding hydrophobicity, a

significant lowering of hydrophobic values was observed in all groups tested after immersion in *C. albicans* biofilms, except in AT in the 3 periods evaluated. These results corroborated that CAs groups improve the physico-chemical characteristics of RATs, among them the OCA group with hydrophobic properties and with lowest mean values of roughness in three evaluated periods. On the other hand, BCA group didn't change the roughness of the surface after immersion in biofilms. Finally, confocal microscope images revealed that ethyl cyanoacrylate groups have a greater effectiveness in inhibiting microbial adhesion.

Key words: Dentures, *Candida albicans*, adhesives, tissue adhesives

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PTS = Próteses Totais

PR = Próteses removíveis

EP = Estomatite protética

CAs = Cianoacrilatos

RAT = Resina acrílica termopolimerizável

GC = Grupo controle

ECAc = Etil cianoacrilato convencional

ECAg = Etil cianoacrilato em gel

BCA = Butil cianoacrilato

OCA = Octil cianoacrilato

AT = Adesivo tissular a base de veneno de cobra

C. albicans = Cândida albicans

spp = Espécie

µm = Micrômetro

mL = Mililitro

p = Nível de significância

° = Graus

mm = Milímetros

MC = Microscópio Confocal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	ARTIGO	23
2.1	Resumo	26
2.2	Introdução	28
2.3	Materiais e métodos	32
2.3.1	Espécimes	32
2.3.2	Materiais de revestimento	33
2.3.3	Rugosidade superficial	33
2.3.4	Hidrofobicidade superficial	34
2.3.4.1	Padronização de <i>C. albicans</i>	34
2.3.4.2	Formação do biofilme	35
2.3.4.3	Remoção do biofilme	35
2.3.4.4	Avaliações descritivas das imagens em MC	36
2.3.4.5	Avaliação final da rugosidade e hidrofobicidade superficial	36
2.3.5	Resultados	37
2.3.6	Discussão	39
2.3.7	Conclusões	43
2.3.8	Referências Bibliográficas	44
3	DISCUSSÃO	63
4	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXOS	85

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a Odontologia tem apresentado muitos avanços tecnológicos como procedimentos de diagnóstico até planos de tratamento. Apesar destes avanços a perda dentária continua sendo um grave problema de saúde, especialmente entre os pacientes idosos. Atualmente, com o aumento da sobrevida no mundo, as estatísticas apontam que durante o século XXI a porcentagem destes indivíduos no Brasil irá crescer aproximadamente oito vezes mais do que a de jovens e duas vezes mais do que a população geral (SESMA; MORIMOTO, 2011).

Dados oferecidos pelo Ministério Nacional de Saúde revelaram que sete milhões de idosos precisam de próteses totais (PTs) mono ou bimaxilar. Estes dispositivos têm o objetivo de restabelecer as funções perdidas recorrentes do edentulismo tais como: a alimentação, a fala e a estética, uma vez que ocorre a reabsorção do osso alveolar, modificando os padrões ósseos e musculares do indivíduo (DA COSTA et al., 2013).

No entanto, estudos apontam que dentre os usuários de PTs, 15-70% apresentam candidose oral associada a próteses removíveis, também conhecida como Estomatite Protética (EP) (GENDREAU; LOEWY, 2011).

A EP é definida como um processo inflamatório, crônico da mucosa bucal, de difícil tratamento devido a sua etiologia multifatorial a qual envolve: a alergia ao monômero residual, trauma causado pela prótese, o uso noturno da prótese, à hipossalivação, a dieta do paciente, o uso de fármacos indutores de xerostomia, os fatores sistêmicos como deficiências nutricionais, diabetes e imunocomprometimento e, principalmente, a formação de placa microbiana e contaminação por *Candida spp*, destacando-se o subtipo *C. albicans* (EMAMI et al., 2014; GENDREAU; LOEWY, 2011; LALLA; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2014; MARTINEZ et al., 2013; PINKE et al., 2016; SOLLECITO; STOPPLER, 2014).

Numa primeira instância, este fungo apresenta-se de forma inócua (levedura) encontrando-se em aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos saudáveis. Mas em determinadas condições ambientais (uso de PTs), este fungo pode evoluir a uma condição patológica (hifa) pela invasão tecidual localizada nas mucosas (CALDERONE; FONZI, 2001; STOPPLER; SOLLECITO, 2014).

Ao mesmo tempo, pela deglutição dos alimentos, o biofilme de *C. albicans* poderia se deslocar para outras regiões como o trato gastrointestinal e isto pode agravar o quadro das

infecções sistêmicas nos pacientes imunocomprometidos, que resultam em taxas de mortalidade de 26 a 60% entre esses pacientes (DAS et al., 2011; TANWAR et al., 2013; YONEYAMA et al., 2002; SCHMID et al., 1992; KLEIN et al., 1984).

Contudo, a capacidade de adesão dos fungos às PTs se torna fundamental para o desenvolvimento da doença. Este processo de adesão envolve um mecanismo complexo o qual é influenciado pelo meio exposto, virulência do patógeno e pelas características físico-químicas da superfície protética (ALI; ALHARBI; SURESH, 2013; Al – DWAIRI; AL-QURAN; AL-OMARI, 2012; BOURLIDI et al., 2016; CALDERONE; FONZI, 2001, PEREIRA-CENCI et al., 2007; HAHNEL et al., 2010; RODRIGUEZ ACOSTA et al., 2015). A relação entre os microrganismos e a superfície protética tem sido amplamente estudada na literatura, determinando duas propriedades físico-químicas que influenciam diretamente na adesão de *C. albicans*: a rugosidade superficial e a hidrofobicidade do substrato (BULAD et al., 2004; NIKAWA et al., 1992).

Ramage et al. (2004) observaram que este microrganismo tende a proteger-se nas irregularidades da resina acrílica, que servem como nichos para os microrganismos se protegerem contra as forças de cisalhamento produzidas pela deglutição, o efeito autolimpante da saliva e a escovação empregada como meio de higienização das próteses, tornando sua remoção mecânica mais difícil. Além disso, estas irregularidades que variam entre 3 µm até 7 µm funcionam como caminhos que estimulam o crescimento e o desenvolvimento destas células. Esta característica é também conhecida como tigmotropismo, visto também em plantas como a videira (MAYAHARA et al., 2014).

Diante disso, a rugosidade superficial torna-se extremamente crítica para a PT, já que sua superfície interna não recebe processos de acabamento e polimento como os realizados na superfície externa das PTs (o que tornaria uma superfície menos rugosa) visto que, se fossem realizados, poderiam diminuir a adaptação e retenção da prótese. Como agravante a estas condições, os ajustes clínicos periódicos com brocas geram irregularidades na resina acrílica, permitindo o acúmulo e a penetração de patógenos no interior da prótese (RAHAL et al., 2004; PEREIRA-CENCI et al., 2007).

Outra característica determinante na adesão do biofilme de *C. albicans* é a hidrofobicidade superficial que apresentam os substratos. Esta é definida como o grau de repulsão à água que um substrato possui, podendo informar as características químicas do material. Neste cenário, se a superfície é molhável ($< 90^\circ$) pode ser denominada hidrofílica e no caso contrário hidrofóbica ($> 90^\circ$). Distintos trabalhos mostraram que usualmente os substratos com superfícies hidrofílicas apresentaram ângulos de contato entre 10 e 30°. Por

outro lado as superfícies hidrofóbicas que apresentavam afinidade com a água revelaram ângulos de contato entre 70 e 90°. No que se refere às resinas acrílicas termopolimerizáveis encontra-se na literatura uma multiplicidade de valores de ângulo de contato segundo a marca comercial: Lucitone (68.64°), Meliodent (78.65°) e VIPI wave (70.23) entre outras 9 resinas termopolimerizáveis que variam entre 69-90° (DARVELL; RODRIGUEZ ACOSTA, et al. 2014; YILDRIM et al., 2005; SERRANO-GRANGER et al., 2005; MINAGI et al., 1985).

Quanto à característica facilitadora de adesão de *C. albicans*, uma mudança nos valores de hidrofobicidade, seja por alterações na composição ou por revestimentos, poderia diminuir a adesão inicial do microrganismo em comparação aos substratos hidrofílicos (KOCH; BURGUERS; HAHNEL, 2013; KANG et al., 2013; YILDRIM et al., 2005; MINAGI et al., 1985). Porém esse resultado dependerá também de distintos fatores como a hidrofobicidade da parede celular do fungo e a habilidade dos microrganismos em modificar as características superficiais de sua parede celular como resposta aos desafios ambientais presentes (RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999; BOURLIDI et al., 2016; LAZARIN et al., 2013; PEREIRA – CENCI et al., 2007).

Sabendo-se que o biofilme da prótese está intimamente relacionado ao desenvolvimento de patologias inflamatórias como a EP, tratamentos têm sido propostos com o intuito de eliminar ou prevenir o desenvolvimento de biofilmes. Dentre eles destacam-se: o uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos, a correta higiene oral, o emprego de soluções químicas utilizadas em protocolos de desinfecção (hipoclorito de sódio 1%, digluconato de Clorexidina 2%, perborato de sódio, peróxido de hidrogênio, entre outros), a substituição de próteses antigas, a eliminação de irregularidades anatômicas, o restabelecimento da oclusão atraumática, a remoção da prótese durante a noite e o controle da dieta do paciente.

Embora os antifúngicos sistêmicos ofereçam ótimos resultados para tratar a EP, estes apresentam efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos potenciais, comprometendo assim a saúde dos pacientes. Já os agentes tópicos como a nistatina e miconazol, empregados amplamente para o tratamento da EP, propicia uma recolonização do biofilme e consequentemente uma re-infecção da mucosa oral, resultando em taxas de recidiva clínica em até duas semanas após a terapia de tratamento da EP (SAMET et al., 2007).

Por outro lado, ainda que o uso de desinfetantes químicos seja de importância para o controle do biofilme microbiano, existem muitas controvérsias quanto ao tipo de desinfetante, ao período de desinfecção das próteses e a concentração que deve ser utilizada para conseguir um resultado satisfatório sem prejudicar as características da PT. Outro meio de higienização bastante empregado é a escovação mecânica, no entanto pesquisas apontam que a maioria da

população usuária falha em mantê-las limpas. Isto é consequência da capacidade visual reduzida e a destreza manual limitada que apresenta a população idosa portadora de PT (PINTO et al., 2010; CARTER; KERR; SHEPHERD, 1986; NEPPELENBROEK et al., 2008; SRINIVASAN; GULABANI et al., 2010).

E por fim, as irregularidades e porosidades presentes na base das PTs, facilitam o impedimento de uma remoção eficaz deste biofilme (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997; MORGAN; WILSON, 2001).

Neste contexto, a utilização de meios preventivos para evitar o desenvolvimento da doença parece ser a melhor opção. Atualmente pesquisas vem se direcionando para a modificação das características superficiais dos biomateriais, visando conseguir uma superfície mais lisa que dificulte a adesão microbiana. Para este fim vem se estudando polimentos líquidos ou materiais que sirvam como revestimentos para as bases das próteses tais como: dióxido de titânio, óleos, monômeros, polímeros e até esmaltes de alta polimerização (YODMONGKOL et al., 2014; BOURLIDI et al., 2016; LAZARIN et al., 2013; BLOSSEY, 2003; CUELLAR-CRUZ et al., 2012; MONTEIRO et al., 2009; SILVA et al., 2016). Muitos deles apresentam bons resultados a curto prazo, no entanto sua permanência e ação no ambiente oral, além da sua resistência frente aos mecanismos de limpeza utilizados como protocolos de manutenção das PTs a longo prazo, são questionáveis. Cabe salientar também que muitos materiais estudados não estão disponíveis no mercado, ademais do seu alto custo e difícil aplicação sobre as resinas acrílicas.

Diante do elevado índice de recorrência da estomatite protética e da responsabilidade clínica e social para com os usuários de PT, torna-se necessário desenvolver produtos ou estudar materiais já disponíveis no mercado que possam contribuir com a melhoria das características físico-químicas das superfícies internas das PTs e, conseqüentemente serem resistentes ao biofilme de *C. albicans*.

Para tal, os adesivos sintéticos a base de cianoacrilatos (CA) são substâncias líquidas que poderiam ser utilizadas como revestimentos de PTs. Encontram-se disponíveis no mercado e já têm sido amplamente estudados na área da medicina assim como na área da odontologia, destacando dentre suas características propriedades antiaderentes (VASTANI; MARIA, 2013; DE MELO et al., 2013; ALI; ALHARBI; SURESH, 2013; BARBOSA et al., 2008; COBB; AHMAD; KUMAR, 2011). Outro material interessante, neste caso de origem orgânico, é o adesivo tissular a base de veneno de cobra (AT). Este produto vem sendo estudado tanto na área médica como odontológica demonstrando resultados favoráveis como substituto de suturas (BARBIZAN et al., 2013; IUAN et al., 1995; BARBOSA et al., 2008).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos:

1. Aferir a rugosidade e hidrofobicidade dos adesivos sintéticos a base de CAs: etil- cianoacrilato (Superbond[®]), etil-cianoacrilato em gel (Superbond em gel[®]), butil-cianoacrilato (Tekbond[®]), octil- cianoacrilato (Dermabond[®]) e orgânico a base de veneno de cobra (C.E.V.A.P), quando aplicados em resina acrílica termopolimerizável.
2. Analisar a rugosidade e hidrofobicidade dos materiais testados quando submetidos a 7, 14 e 30 dias em biofilme de *C. albicans*.
3. Avaliar e descrever a adesão de células aderidas à superfície após 7, 14 e 28 dias de imersão em biofilme de *C. albicans*, por meio de imagens obtidas em microscópio confocal.

Duas hipóteses nulas foram adotadas para este estudo: 1. Os CAs e o AT não conseguem diminuir a rugosidade nem manter a hidrofobicidade das RATs antes da imersão em biofilme de *C. albicans*. 2. Os CAs e o AT não conseguem manter suas características iniciais após imersão em biofilme de *C. albicans*.

2 ARTIGO

2 ARTIGO

O artigo do presente projeto foi redigido de acordo com as instruções e diretrizes para a submissão de artigos da revista “Journal of Prosthetic Dentistry”.

TÍTULO:

Modificação das propriedades superficiais dos polímeros sintéticos e orgânicos após imersão em biofilme de *C.albicans*

RESUMO:

Enunciado do problema: A rugosidade e hidrofobicidade das resinas acrílicas termopolimerizáveis (RAT) favorecem a colonização de microrganismos e consequentemente o desenvolvimento da estomatite protética.

Objetivos: Avaliar a rugosidade e hidrofobicidade superficial de 4 adesivos sintéticos e 1 orgânico aplicados em RATs antes e após 7, 14 e 30 dias de imersão em biofilme de *C. albicans*.

Materiais e Métodos: Foram confeccionados 108 espécimes de RAT (10x10x3mm), aplicados nos seguintes adesivos: Etil-cianoacrilato, etil-cianoacrilato gel, butil-cianoacrilato, octil-cianoacrilato e adesivo base de veneno de cobra. Seguidamente, os espécimes passaram pelas leituras da rugosidade e hidrofobicidade, para depois serem esterilizados e inoculados com *C. albicans* SC5314 (1.107 células/mL) durante 7, 14 e 30 dias. Concluídos os períodos avaliados, foi selecionado um espécime de cada grupo para a análise em microscópio confocal e simultaneamente os demais, previamente esterilizados, passaram pelas avaliações da rugosidade e hidrofobicidade. Foram utilizados os testes anova 1 e 2 critérios. Para as diferenças encontradas, foi utilizado o teste de Tukey considerando um nível de significância de 5%.

Resultados: Inicialmente, todos os grupos cianoacrilatos conseguiram manter propriedades hidrofóbicas e diminuir a rugosidade superficial das RATs, destacando-se o grupo octil-cianoacrilato. Foi constatada que a imersão em biofilme de *C. albicans* diminuiu a rugosidade

em todos os grupos avaliados, exceto o grupo butil cianoacrilato. Além disso demonstrou-se uma diminuição dos valores hidrofóbicos em todos os grupos cianoacrilatos.

Conclusões: O grupo octil cianoacrilato apresentou melhores características hidrofóbicas e os menores valores médios de rugosidade, enquanto o butil cianoacrilato evidenciou uma rugosidade inalterada após imersão em biofilme de *C. albicans*. As imagens de microscopia confocal mostraram maior efetividade em inibir a adesão microbiana para os grupos etil cianoacrilatos.

ABSTRACT:

Statement of the problem: The high roughness and hydrophobicity of heat-polymerised acrylic resin (HPAR) favor the colonization of *C. albicans*, which may result in the development of prosthetic stomatitis.

Purpose: Evaluate the hydrophobicity and roughness of synthetic and organic adhesive when applied on HPAR before and after 7, 14 and 30 days of being immersed in *C. albicans* biofilms.

Material and Methods: 108 specimens of HPAR were fabricated and applied adhesives tested: ethyl-cyanoacrylate, ethyl-cyanoacrylate gel, butyl-cyanoacrylate, octyl-cyanoacrylate and fibrin sealant derived from snake-venom. Following, specimens passed by roughness and hydrophobicity readings, for then sterilized and inoculated with *C. albicans* SC5314 (1.10^7 cells/mL) for 7, 14 and 30 days. After immersion periods of each groups, one specimen was selected for confocal microscope analysis, while the others, previously sterilized, were passed by roughness and hydrophobicity measurements. One way and two way anova tests were used. For differences found, the Tukey test was used considering a significance level of 5%.

Results: All cyanoacrylates groups were able to maintain hydrophobic properties and to reduce surface roughness of HPAR, standing out octyl-cyanoacrylate group. It was verified that immersion in biofilm of *C. albicans* decreases the roughness in all groups, except butyl-cyanoacrylate group. Additionally, a decrease in hydrophobic values was demonstrated in all cyanoacrylates groups.

Conclusion: Octyl cyanoacrylate group showed better hydrophobic characteristics and lower mean roughness values, while butyl cyanoacrylate exhibited an unchanged roughness after immersion in *C. albicans* biofilm. Confocal microscopy images showed greater effectiveness in inhibiting microbial adhesion to the ethyl cyanoacrylates groups.

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Os adesivos a base de cianoacrilatos alteram as propriedades superficiais da resina acrílica podendo reduzir a formação do biofilme microbiano sobre as resinas acrílicas termopolimerizáveis. Mais experimentos são necessários para verificar essa abordagem.

INTRODUÇÃO

A candidose oral é a infecção fúngica mais comum em humanos originada principalmente, pela presença de *Cândida ssp.*, cujo subtipo *C. albicans* é o mais predominante. A *C. albicans* é um fungo assexual diploide, de forma arredondada ou ovalada, gram positivo e de metabolismo principalmente aeróbio. Vive como comensal dentro da cavidade bucal, apresentando-se de forma inócua (levedura) e colonizando as superfícies das mucosas. Nas pessoas saudáveis os mecanismos de defesa imunológicos (saliva) e não imunológicos (descamação do epitélio bucal) impedem a instalação do microrganismo nos tecidos. No entanto, quando quebrada a homeostasia do meio bucal, este microrganismo

poderia atuar como patógeno oportunista (hifa) colonizando e infectando mucosas e tecidos, podendo causar assim infecções locais e sistêmicas¹⁻³.

Nos pacientes imunocomprometidos, a candidose oral pode agravar o quadro das infecções sistêmicas, devido à evolução para a região orofaríngea dos microrganismos. Assim ocorre a constante aspiração e deglutição das espécies fúngicas, resultando em significativas taxas de mortalidade (26 a 60%) entre esses pacientes³⁻⁸.

A candidose oral pode estar associada ao uso de próteses removíveis (PR) e é também conhecida como Estomatite Protética (EP). A EP é definida como um processo inflamatório, crônico da mucosa bucal cuja prevalência atinge valores de 15-70%⁹⁻¹¹. É de difícil tratamento devido a sua etiologia multifatorial e dentre os fatores de risco se destacam: alergia ao monômero residual, trauma causado pela prótese, o uso noturno da prótese, a dieta do paciente, o uso de fármacos indutores de xerostomia, os fatores sistêmicos como deficiências nutricionais, diabetes e imunocomprometimento e principalmente o acúmulo de placa microbiana e a contaminação por *C. albicans*^{9, 12-18}.

A capacidade dos fungos do gênero *Cândida* em se aderir as próteses é crucial para o desenvolvimento desta doença, sendo que o seu processo de adesão envolve um mecanismo complexo o qual é influenciado pelo meio exposto, virulência do patógeno (propriedades bioquímicas) e pelas características físico-químicas da superfície na qual será colonizada, resultando assim, na alteração da estabilidade da microbiota^{2, 10, 16-21}.

Quanto às características físico-químicas, tem se observado que a molhabilidade do substrato pode influenciar a composição da película salivar adquirida e conseqüentemente a adesão inicial dos microrganismos. Apesar das controvérsias que existem na literatura, os estudos determinam que os substratos que apresenta menor formação de biofilme microbiano são aqueles que apresentam sua superfície hidrofóbica²²⁻²⁵.

Outra característica superficial relevante que determinará o volume e a permanência do biofilme microbiano sobre as resinas acrílicas é a rugosidade superficial. Esta propriedade está intimamente relacionada com a adesão inicial e preservação do fungo, pois funciona como nichos para abrigo dos microrganismos, protegendo-os das forças de cisalhamento produzidas dentro da cavidade oral (deglutição)^{18, 20, 26}. As superfícies rugosas são difíceis de limpeza, resultando em um rápido crescimento do biofilme através da multiplicação das espécies remanescentes^{23, 27}. As superfícies internas das bases das PR devem possuir um contato mínimo com a mucosa subjacente com fins de estabelecer uma adequada adaptação e retenção da prótese. Esta superfície interna apresenta uma rugosidade de aproximadamente 3µm diferindo da superfície externa lisa que mostra uma rugosidade aproximada de 0,03 µm^{10, 28}. A falta de um adequado polimento da superfície interna preserva o contato próximo entre a mucosa e a prótese removível, embora estes altos valores representem um nicho para o desenvolvimento do biofilme^{19, 29}.

Com o objetivo de melhorar as características que contribuem com o desenvolvimento microbiano, pesquisas vem se concentrando na busca de materiais que possam ser utilizados como revestimentos superficiais capazes de diminuir ou eliminar a formação do biofilme e que contribuam com a melhoria das características superficiais das resinas acrílicas, minimizando assim as doenças infecciosas, como a EP^{26, 30-37}.

Neste contexto, os adesivos sintéticos a base de cianoacrilatos (CA), produtos comercialmente disponíveis, apresentam propriedades interessantes para funcionar como materiais de revestimento de superfície, melhorando as características superficiais e assim agindo no controle de biofilmes. Os CAs são substâncias líquidas (monômeros), de baixa viscosidade, incolores e derivados do ácido cianoacrilico, apresentando a fórmula geral $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOR}$, de forma que o R pode representar cadeias radicais de diversos tamanhos como: radical metil ($\text{R}=\text{CH}_3$), etil ($\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$), butil e isobutil ($\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9$) e octil-cianoacrilato

($R=C_8H_{17}$)³⁸. Os CAs polimerizam em poucos minutos, quando entram em contato com a água, ar e superfícies tais como endotélio, mucosa, pele, sangue e osso, degradando-se em cianoacetato e formaldeído, com ligeira reação exotérmica. Por serem de forma líquida, possuem a habilidade de penetrar em superfícies irregulares dos tecidos, promovendo uma forte adesão³⁹.

Esses produtos vêm sendo utilizados na medicina e na odontologia por vários anos. Na área da odontologia, seu uso tem sido incorporado em diferentes procedimentos, especialmente cirúrgicos, como em levantamento de seio maxilar, fixação de membranas e enxertos de bloco autógeno e fechamento de bordas de retalhos, assim como também têm sido empregados para ferulizar dentes avulsionados e na endodontia como meio auxiliar no isolamento absoluto³⁹⁻⁴⁵.

O Octil-cianoacrilato, já tem sido empregado como material de revestimento superficial sobre resinas acrílicas, conseguindo uma inibição completa na adesão de *C. albicans*¹⁶.

Da mesma forma outro produto, neste caso biológico, que também possui as características de um material de revestimento de PTs, é o adesivo tissular a base de veneno de cobra (AT). Inicialmente o AT foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores da UNESP no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), com o intuito de reparar nervos periféricos e a possível utilização em outros campos da medicina. O AT é composto de três soluções que ao serem misturadas polimerizam e formam o adesivo. Os compostos são: fibrinogênio (solução 1) extraído pelo processo de crioprecipitação do sangue de búfalo; cloreto de cálcio (solução 2); e proteína extraída do veneno de serpente (solução 3) da espécie *Crotalus durissus terrificus* e submetido a alguns tratamentos moleculares⁴⁶.

Na área da odontologia, o AT foi utilizado em pesquisas com a finalidade de determinar a possibilidade de substituir as suturas de enxertos gengivais livres por adesivos à

base de veneno de cobra. Os resultados histológicos demonstraram um melhor resultado aos sete dias, porém aos 14 e 45 dias a maturação do tecido ocorreu com as mesmas características em todos os grupos testados⁴⁷.

Neste contexto, torna-se necessário desenvolver produtos ou estudar materiais já disponíveis no mercado que possam aprimorar as características físico-químicas das superfícies internas das PTs e, conseqüentemente diminuir ou eliminar a formação de biofilme de *C. albicans*. Para tal, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a influência dos adesivos sintéticos e orgânico sobre a rugosidade e hidrofobicidade superficial das RAT antes e após 7, 14 e 30 dias de serem submetidos em biofilme de *C. albicans*, ademais de analisar e descrever a adesão de células fúngicas sobre os materiais testados através de imagens obtidas em microscópio confocal.

Duas hipóteses nulas foram adotadas para este estudo: 1. Os CAs e o AT não conseguem diminuir a rugosidade nem manter a hidrofobicidade das RATs antes da imersão em biofilme de *C. albicans*. 2. Os CAs e o AT não conseguem manter suas características iniciais após imersão em biofilme de *C. albicans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes

108 espécimes foram fabricados a partir de um padrão de silicone Zetalabor (Hard 85 Shore-A, Zhermack, Badia Polesine, Itália) (10 x 10 x 3 mm) utilizando uma matriz metálica, entre duas placas de vidro previamente isoladas sob pressão padronizada de 5 Kgf⁷. Estes padrões de silicone foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante e substituídos em resina acrílica termopolimerizável (Vipicril Plus, VIPI Indústria, Comércio, Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil) em

termopolimerizadora digital (Solab, Piracicaba, SP, Brasil). Após a polimerização, os espécimes foram cortados usando uma broca metálica (Maxi-cut, Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) e uma superfície foi polida por 15 segundos usando uma lixa de granulação 120 (Norton Abrasivos, São Paulo, Brasil) em uma politriz metalográfica de dispositivos múltiplos (PLFDV, Fortel Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil) sob refrigeração usando uma matriz circular de aço inoxidável. Em seguida, os espécimes foram limpos em ultrassom, por 20 minutos com água destilada, para remoção de quaisquer contaminantes e artefatos da superfície acrílica (Ultrasonic Cleaner, Indaiatuba, SP, Brasil)²⁰. Para eliminar o monômero residual, os espécimes foram imersos em 2 mL de água destilada a 37 ° C durante 48 horas de acordo com a ISO 1567: 1988 (International Organization for Standardization Specification 1567, 1988). Em seguida, o valor de rugosidade da superfície foi estabelecido entre 3-4 µm num rugosímetro (Surftest SJ-301, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japão) com o fim de simular a superfície interna da PR, obtendo-se uma média a partir de seis pontos diferentes em cada espécime^{10, 28, 29}.

Adesivos

Os espécimes foram revestidos com uma gota de 50 µL para cada adesivo avaliado, utilizados neste estudo como materiais de revestimento superficial, os quais foram uniformemente distribuídos com o auxílio de um pincel (Disposable Brush tips/60, 3M ESPE, St Paul, Minnesota, U.S.A)^{48, 49}. Este processo foi repetido 2 vezes, a fim de adquirir duas camadas de revestimento na superfície. Em seguida, terminado o processo de polimerização, os espécimes passaram pelas avaliações quantitativas iniciais da rugosidade (perfilômetro) e hidrofobicidade (goniômetro). **Ver tabela 1**

Rugosidade Superficial

Após a aplicação dos materiais de revestimento, os espécimes foram mensurados através do perfilômetro de contato Marsurf GD25 (Mahr Metrology, Mahr Metering Systems GmbH

Göttingen, Alemanha), para adquirir os dados referentes à rugosidade superficial. Foram realizadas 6 leituras (três verticais e três horizontais) na superfície dos espécimes, sendo considerada a média aritmética (Ra) entre os picos e vales percorridos pela ponta ativa do aparelho, com percurso de medição de 3 mm, comprimento de onda limite de 0,8 mm e velocidade de 0,5 mm/s^{50, 51}.

Hidrofobicidade Superficial

Para o cálculo da hidrofobicidade das superfícies, os ângulos de contato dos espécimes foram mensurados utilizando-se um goniômetro (Contact Angle System OCA – Dataphysics, Fiderstadt, Alemanha), o qual foi acoplado a uma Bomba de Infusão – BI 2000 (Inside Equipments). O aparelho possui uma câmera (Charge – Coupled Device) CCD (Dataphysics, Fiderstadt, Alemanha), que registra a imagem da gota de água mili-Q sobre a superfície do espécime, e um software de processamento de imagem para determinar o ângulo direito e esquerdo da gota, obtendo-se assim uma média. Foram realizadas 3 medidas por cada espécime, obtendo-se uma média obtida dos ângulos de contato aferidos^{26, 52}.

Após as avaliações iniciais, os espécimes passaram por esterilização em óxido de etileno (ACECIL, Campinas, Brasil), para logo dividir cada grupo experimental em 3 subgrupos: 7 dias (n=6), 14 dias (n=6) e 30 dias (n=6)^{53, 54}.

Padronização de *C. albicans*

Inicialmente, a cepa *C. albicans* (SC5314) foi incubada num caldo de soja tríptico (TSB) (Accumedia Manufactures, Inc. Lansing, USA) adicionado com 1% de cloranfenicol (Quemicetina Succinato/ Carlo Erba®, Milano, MI, Italy) durante 24 horas a 30° em condições aeróbicas⁵⁵. Seguidamente, a suspensão fúngica foi centrifugada durante 10 minutos a 5000 rpm a 22 °C para a separação dos microrganismos. Logo depois, realizou-se a lavagem dos fungos com solução tamponada de fosfato (PBS), sendo que o sedimento final foi re-suspenso em 1mL de PBS. Por conseguinte, 10µL da suspensão foram diluídos em PBS

na proporção de 1: 10.000 para contagem de células fúngicas através do microscópio biológico binocular Leica DM500 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), com o fim de ajustar a concentração. Finalmente a suspensão fúngica foi padronizada na concentração de 1×10^7 células/ mL hemacitômetro⁵⁶.

Formação do biofilme

Após a esterilização em óxido de etileno, todos os espécimes foram expostos a 1 mL de saliva artificial para desenvolvimento da película adquirida por 2 horas a 37 °C numa placa de 24 poços (Cell Culture Plate, Nest Biotech Co., Ltd., China), e depois foram secas à temperatura ambiente durante 30 minutos²⁰. Em seguida, os espécimes foram imersos com 1 mL de suspensão fúngica (previamente padronizada) e permaneceram em agitação orbital (Nova Técnica NT-145, Mix Equipamentos Ltda, Joinville – Santa Catarina, Brasil) (75 rpm) durante 90 minutos a 37 °C^{54, 57}. Concluído esse período, os espécimes foram lavados duas vezes em 1 mL de PBS para remoção das células não aderidas⁵⁴, para logo serem imersos em 1 mL de solução Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Gibco®, GrandIsland, NY, U.S.A) permanecendo em agitação orbital (75 rpm) durante 7, 14 e 30 dias a 37 °C⁵⁶⁻⁵⁸. Durante este período, o meio de cultura foi mudado a cada 24 horas⁵⁹.

Remoção de Biofilme

Concluído os períodos de avaliação de cada grupo, separou-se um espécime de cada conjunto para a avaliação das imagens em microscópio confocal Leica TCS - SPE (MC) (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Em seguida os espécimes restantes foram retirados do meio de cultura e lavados três vezes em 1 mL de PBS. Logo após, foi realizada a remoção do biofilme utilizando um raspador de células estéril 3010 (Costar, Sigma-Aldrich Co., Toluca, México) numa placa de 24 poços com força constante em todas as direções. Posteriormente, os espécimes foram novamente lavados mais três vezes e deixados secar à temperatura

ambiente sob exposição à luz UV por 6 horas. Ao final os espécimes foram empacotados e esterilizados em óxido de etileno.

Somente após a esterilização em óxido de etileno é que foram realizadas as mensurações quantitativas finais da rugosidade superficial e hidrofobicidade.

Avaliações descritivas das imagens em MC

Após as 24 horas de incubação em RPMI, os espécimes selecionados para análise em MC, foram imersos em 1 ml de PBS contido numa placa de cultura de 24 poços para remoção das células não aderidas. Concluída a lavagem os espécimes foram transferidos numa nova placa de 24 poços, contendo 1 mL de PBS, misturado com 1 µL do fluorocromo SYTO-9 (Molecular Probes. Invitrogen Brasil Ltd. São Paulo, SP) e 1 µL do fluorocromo iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A)⁵⁴. Na sequência, foram aguardados 20 minutos para difusão dos fluorocromos no biofilme. Esse procedimento foi realizado na ausência de luz a 37° C, de acordo com as orientações do fabricante. Imediatamente após o período de incubação, cada corpo de prova foi cuidadosamente montado em lamínula de vidro associada a óleo de imersão, com a face rugosa abaixo, para análise do biofilme em microscópio confocal Leica TCS-SPE. A objetiva usada foi uma lente de imersão em óleo (40x; abertura numérica de 1,15).

Avaliação final da rugosidade e hidrofobicidade após imersão em biofilme de *C. albicans*

Todos os espécimes esterilizados por óxido de etileno passaram pelas mensurações finais da rugosidade (perfilômetro) e hidrofobicidade (goniômetro) previamente descritas.

Para a análise dos valores iniciais da rugosidade e hidrofobicidade foi adotado o teste ANOVA 1 e para a comparação entre os materiais e os períodos de avaliação após a imersão em biofilme de *C. albicans* foi utilizado o teste ANOVA 2 critérios. Para as diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste de comparação múltipla (Teste de Tukey). Por outro lado, para

a análise das imagens em MC foi realizada uma avaliação descritiva dos resultados. Finalmente, foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Rugosidade superficial e hidrofobicidade dos revestimentos sintéticos e orgânico antes da imersão em biofilme de *C. albicans*

Rugosidade

De acordo com o teste da rugosidade, os grupos CAs demonstraram diferenças significativas quando comparados com o GC (3.76 ± 0.65) ($p < 0,05$), revelando uma menor rugosidade nos grupos OCA (0.61 ± 0.17) ($p = 0.0001$) e BCA (0.78 ± 0.24) ($p = 0.0001$). No entanto não se observou qualquer diferença estatística quando comparado o GC com o AT (3.63 ± 0.36) ($p = 0.99$). **Ver tabela 2 e gráfico 1.**

Hidrofobicidade

Em relação ao teste da hidrofobicidade foram observados menores valores em todos os grupos em relação ao GC (120.29 ± 4.32), destacando o grupo AT com os menores valores médios (59.49 ± 12.68). Também foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos GC, ECAG, BCA, OCA e AT quando comparados com o grupo ECAC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos: GC, ECAG, BCA e OCA. **Ver tabela 2 e gráfico 2.**

Rugosidade superficial e hidrofobicidade dos revestimentos sintéticos e orgânico após 7, 14 e 30 dias de imersão em biofilme de *C. albicans*

Rugosidade

Após a imersão em biofilme de *C. albicans* foi observada uma redução estatisticamente significativa entre o período de avaliação inicial e final dos grupos aferidos, exceto para o grupo BCA. O grupo OCA apresentou os menores valores médios de rugosidade, seguido do grupo BCA. Avaliando cada grupo experimental individualmente, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de avaliação aferidos (7, 14 e 30 dias). **Ver tabela 3 e gráfico 3.**

Hidrofobicidade

Em relação aos valores da hidrofobicidade foi observada uma diminuição estatisticamente significativa em todos os grupos experimentais com exceção do AT. O grupo OCA foi o revestimento que apresentou os maiores valores médios iniciais nos três períodos avaliados quando comparados com os outros CAs. Os grupos ECAC e BCA diminuíram seus valores hidrofóbicos nos 7 e 14 dias de avaliação, porém aos 30 dias se observou um aumento destes valores. Diferentemente foi verificado no grupo ECAG e GC, uma redução gradual dos valores hidrofóbicos, evidenciando-se valores hidrofílicos nos 14 e 30 dias. **Ver tabela 3 e gráfico 4.**

Figura 1 (MC)

As imagens em microscopia confocal após 7 dias de desenvolvimento em biofilme de *C. albicans* revelaram a presença de células fúngicas remanescentes na forma de levedura e hifa em todas as superfícies testadas, no entanto observou-se um menor acúmulo de células aderidas nos grupos CAs, destacando-se o ECAC com um menor número de células viáveis e não viáveis aderidas à superfície, seguidamente do grupo ECAG, BCA e OCA. Simultaneamente observou-se que os grupos GC e AT se destacaram por apresentar uma grande quantidade de células fúngicas viáveis aderidas à superfície, ressaltando o grupo AT

ressaltando com uma maior densidade de células fúngicas viáveis por unidade de área. **Ver Figura 1**

Figura 2 (MC)

As imagens em microscopia confocal após 14 dias de desenvolvimento em biofilme de *C. albicans* revelaram a presença de células fúngicas remanescentes na forma de levedura e hifa em todas as superfícies testadas, sobressaindo o grupo ECAC com a menor quantidade de células aderidas à superfície, seguidamente dos grupos BCA, OCA e ECAG.

Paralelamente observou-se que os grupos GC e AT se destacaram por apresentar uma grande quantidade de células fúngicas viáveis aderidas à superfície, destacando-se o grupo AT com uma maior densidade de células fúngicas viáveis por unidade de área. **Ver Figura 2**

Figura 3 (MC)

As imagens em microscopia confocal após 28 dias de desenvolvimento em biofilme de *C. albicans* revelaram a presença de células fúngicas remanescentes na forma de levedura e hifa em todas as superfícies testadas, exceto no grupo ECAG que se destacou por não apresentar nenhuma célula aderida sobre a superfície. Em contrapartida, os grupos ECAC, BCA e OCA evidenciaram uma menor quantidade de células aderidas viáveis e não viáveis sobre a superfície, quando comparados com os grupos GC e AT. **Ver Figura 3**

DISCUSSÃO

A rugosidade e hidrofiliabilidade superficial das RATs podem facilitar a retenção e o desenvolvimento microbiano, portanto, buscam-se materiais que possam ser utilizados como meios preventivos para melhorar estas características^{10, 60-63}.

O presente estudo revelou que antes a imersão em biofilme de *C. albicans*, todos os grupos CAs conseguiram diminuir os valores da rugosidade da RAT assim como de apresentar propriedades hidrofóbicas na sua superfície, se destacando os grupos OCA (0.61 μm , 102.47°) e BCA (0.78 μm , 95.57°) com os melhores valores, rejeitando-se a hipótese nula para todos os CAs testados. Por outro lado, o grupo AT não conseguiu demonstrar uma redução nos valores médios de rugosidade, além de tornar hidrofílica a superfície da RAT (3.63 μm , 59.49°) aceitando-se a hipótese nula para este revestimento. Embora utilizando outros produtos, estes achados são similares aos encontrados em estudos anteriores^{10, 28, 30, 31, 60} cujos valores médios de rugosidade encontravam-se acima do limiar de adesão microbiana (0,2 μm), no entanto ao reduzir estes valores por debaixo dos 2 μm se evidenciou uma redução significativa de células aderidas à superfície^{10,23, 27, 62, 64}.

Em contrapartida, embora seja controverso na literatura, determina-se que a hidrofobicidade dos materiais testados só é importante nos estágios iniciais da adesão microbiana⁶⁵, ressaltando que são os substratos hidrofóbicos os que dificultariam a adesão inicial do fungo^{24, 25, 66, 67}. Além disso autores⁶⁸ afirmam que a espécie *C. albicans* apresenta propriedades hidrofílicas na sua parede celular, hipotetizando dessa forma que esta espécie de fungo se desenvolveria melhor em substratos com superfícies igualmente hidrofílicas.

Neste contexto, segundo os resultados obtidos, se esperou que todos os grupos CAs testados apresentassem uma menor formação de células aderidas à superfície já que todos estes apresentaram características hidrofóbicas, além de uma baixa rugosidade superficial, diferentemente do grupo AT que apresentou uma maior rugosidade e propriedades hidrofílicas no substrato.

Estes dados foram corroborados por meio das imagens realizadas em MC, as quais demonstraram uma menor formação de biofilme microbiano nas superfícies tratadas com CAs, porém observou-se que o grupo ECAC foi o revestimento que apresentou uma menor

quantidade de células viáveis aderidas à superfície nos 3 períodos avaliados e o ECAG, aos 30 dias, não apresentou nenhuma célula aderida à superfície. Isto pode ser justificado através da liberação de subprodutos como formaldeído e compostos cianoacetato que poderiam estar relacionados a uma atividade antifúngica^{69, 70}. Segundo alguns autores⁷¹⁻⁷³, estes revestimentos apresentam efeitos citopáticos, cujos efeitos tendem a diminuir dentro dos primeiros 14 dias e permanecer com reações baixas por 28 dias. Por último, outra possibilidade é que tenha ocorrido uma modificação na composição química ou que estes sejam incapazes de estabelecer fortes interações com a RAT, provocando o desprendimento das camadas destes revestimentos com às células aderidas à superfície⁷⁴. Apesar das limitações deste estudo, estes sinais de degradação e envelhecimento foram evidenciados nas imagens 28 dias dos grupos ECAG e OCA, o que posteriormente poderia facilitar a retenção microbiana.

Os grupos BCA e OCA demonstraram uma maior quantidade de células fúngicas remanescentes sobre a superfície quando comparados com os grupos ECAC e ECAG, provavelmente devido à falta de liberação de subprodutos decorrentes das longas cadeias radicais que possuem estes revestimentos o que retardaria seu processo de degradação⁷². Por último, observou-se uma maior quantidade de biofilme aderido nos grupos GC e AT. Isto pode ser justificado pelos altos valores de rugosidade ($> 2 \mu\text{m}$) que apresentaram ambos os grupos em relação aos demais^{10, 23, 28, 62}. Além disso, evidenciou-se uma maior densidade de células fúngicas viáveis no grupo AT aos 7 e 14 dias quando comparadas com o grupo GC, provavelmente devido à presença de proteínas na sua composição que poderiam ter funcionado como reservatórios de nutrientes para o desenvolvimento da *C. albicans* sobre a superfície da RAT⁷⁵.

Em relação aos resultados obtidos após imersão em biofilme de *C. albicans* foi evidenciada modificações tanto na rugosidade como na hidrofobicidade das superfícies

testadas. Numa primeira instância, revelou-se que o grupo GC diminuiu de maneira significativa seus valores hidrofóbicos, tornando-se uma superfície totalmente hidrofílica, concluindo assim que o biofilme de *C.albicans* consegue diminuir as propriedades hidrofóbicas da RAT, com a possibilidade de desenvolver-se melhor sobre esta superfície. Estes achados foram encontrados também em todos os grupos CAs, no entanto o OCA destacou-se como o único material que apresentou valores hidrofóbicos nos 3 períodos avaliados. Enquanto ao grupo AT, superfície inicialmente hidrofílica, não apresentou mudanças significativas durante os períodos de avaliação.

Com respeito à rugosidade, todos os grupos testados reduziram seus valores médios, exceto o grupo BCA; sugerindo assim a hipótese de que houve um envelhecimento dos outros revestimentos aplicados o que poderia ter produzido a queda destes valores. A resistência pode ser justificada a através das cadeias radicais longas que apresentam estes materiais (OCA - $R=C_8H_{17}$ e BCA - $R=C_4H_9$)⁷⁶ outorgando-lhes uma maior resistência à degradação em comparação aos os grupos com cadeias radicais curtas (ECAc e ECAg)⁷³. Dessa forma aceitou-se a hipótese nula para todos os materiais testados após imersão em biofilme de *C.albicans*.

Atualmente não existem trabalhos na literatura que avaliem os efeitos da *C. albicans* sobre a superfície da RAT, no entanto existem autores que afirmam que este microrganismo possui a habilidade de adaptar-se frente aos desafios ambientais às que é submetida regularizando a hidrofobicidade da sua parede celular⁷⁷. No entanto, com relação aos achados neste estudo parece que o biofilme de *C. albicans* também possui a capacidade de condicionar as superfícies das RATs colonizadas, provavelmente para facilitar um melhor desenvolvimento sobre o substrato.

De acordo com nosso estudo pôde-se afirmar que, dentre os grupos CAs que desenvolveram as melhores características superficiais das RATs e que consequentemente

poderiam diminuir o acúmulo de biofilme microbiano, o OCA foi o revestimento que apresentou uma menor rugosidade e uma maior hidrofobicidade nos 3 períodos avaliados, porém cabe salientar o revestimento BCA, que foi o único material que apresentou uma resistência física frente à degradação por biofilme de *C. albicans*. Por último as imagens em MC demonstraram que os grupos etil cianoacrilatos apresentam uma maior efetividade em inibir a adesão das células *C. albicans*.

Contudo, precisam-se de mais estudos biológicos e físicos que avaliem o comportamento destes revestimentos a longo prazo, além da sua resistência frente aos desafios biológicos, mecânicos e químicos.

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados encontrados e dentro das limitações deste estudo se constatou:

- Inicialmente todos os cianoacrilatos conseguiram melhorar as características físico-químicas das RATs, destacando-se dentre eles o grupo octil-cianoacrilato com características hidrofóbicas e com os menores valores médios de rugosidade.
 - O grupo OCA evidenciou os menores valores de rugosidade e os maiores valores de hidrofobicidade em todos os períodos avaliados.
 - Após imersão em biofilme de *C. albicans*, observou-se uma habilidade deste microrganismo para tornar menos rugosa a superfície de todos os grupos, exceto o BCA. Observou-se também a capacidade deste microrganismo em tornar mais hidrofílica as superfícies de RATs tratadas com CAs.
 - A análise das imagens em MC mostrou uma maior redução de células viáveis nos grupos ECAc e ECAg.
-
-

BIBLIOGRAFIA

1. Stoopier ET, Sallecito TP. Oral mucosal diseases: evaluation and management. *Med Clin North Am.* 2014 Nov; 98(6) : 1323-52.
2. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *C. albicans*. *Trends Microbiol.* 2001 Jul; 9(7): 327-35.
3. Shirley KP, Windsor LJ, Eckert GJ, Gregory RL. In vitro effects of *Plantago major* extract, aucubir, and baicalein on *Candida albicans* biofilm formation, metabolic activity, and cell surface hydrophobicity. *J Prosthodont.* 2015 Nov 30.
4. Das I., Nightingale P., Patel M., Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int. J. Infect. Dis.* 2011 Nov;15(11):e759-63.
5. Tanwar J., Das S., Fatima Z., Hameed S. Crusade for opportunity: *Candida albicans* from commensalism to pathogenicity. *J. Hum. Dis.* 2013; 112: 160-167.
6. Yoneyama T, Yoshida M, Ohrui T, Mukaiyama H, Okamoto H, Hoshiba K, et al. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc.* 2002 Mar; 50(3): 430-433.
7. Schmid J, Odds FC, Wiselka MJ, Nicholson KG, Soll DR. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology.* 1992 Apr; 30(4):935-941.
8. Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl.J. Med.* 1984 Aug. 9; 311(6):354-358.

9. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011 Jun;20(4):251-60.
 10. Silva MJ, de Oliveira DG, Marcillo OO, Neppelenbroek KH, Lara VS, Porto VC. Effect of denture-coating composite on *Candida albicans* biofilm and surface degradation after disinfection protocol. *Int Dent J*. 2016 Jan 7.
 11. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *Journal of oral rehabilitation*. 1987 May;14(3):217-27.
 12. Pinke KH, Freitas P, Viera NA, Honório HM, Porto VC, Lara VS. Decreased production of proinflammatory cytokines by monocytes from individuals presenting *Candida*-associated denture stomatitis. *Cytokine*. 2016 Jan; 77:145-51.
 13. Martinez R.F., Jaimes-Aveldanez A., HernandezPerez F., Arenas R., Miguel G.F. Oral *Candida* spp carriers: its prevalence in patients with type 2 diabetes mellitus. *An Bras Dermatol*. 2013 Mar-Apr;88(2):222-5.
 14. Lalla RV, Dongari-Bagtzoglou A. Antifungal medications or disinfectants for denture stomatitis. *Evid Based Dent*. 2014 Jun; 15(2):61-2.
 15. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trial. *J Dent*. 2014 feb; 42(2):99-106.
 16. Ali AA, Alharbi FA, Suresh CS. Effectiveness of coating acrylic resin dentures on preventing *Candida* adhesion. *J Prosthodont*. 2013 Aug; 22 (6):445-50.
-

17. Al-Dwairi ZN, Al-Quran FA, Al-Omari OU. The effect of antifungal agents on surface properties of poly (methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. J Prosthodont Res. 2012 Oct; 56(4):272-80.
 18. 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.
 19. Pereira-Cenci T, Cury AADB, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RCM. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. Int J Prosthodont. 2007; 20: 308-10.
 20. 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.
 21. Rodriguez Acosta EJ, da Silva PM, Jacobina M, Lara VS, Neppelenbroek KH, Porto VC. *Candida albicans* adherence to denture base material: chemical disinfection and the effect of acquired salivary pellicle formation. Journal of prosthodontics. 2015 Apr; 24(3):200-6.
 22. Absolom DR, Zingg W, Neumann AW. Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties. J Biomed Mater Res. 1987 Feb; 21(2):161-71
 23. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, Van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. J Clin Periodontol. 1990 Mar; 17(3):138-44.
-

24. Koch C, Burguers R, Hahnel S. Candida albicans adherence and proliferation in the surface of denture base materials. *Gerodontology*. 2013 Dec; 30(4): 309-13.
 25. 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 Odontol Scand*. 2013 Jan; 71(1): 241-8.
 26. 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. *Arch Oral Biol*. 2013 Jan; 58(1):1-9
 27. 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.
 28. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont*. 2000 Feb; 13(2):136-140.
 29. Rahal JS, Mesquita MF, Henriques GE, Nobilo MA. Surface roughness of acrylic resins submitted to mechanical and chemical polishing. *J Oral Rehabil*. 2004; 31(11): 1075-9.
 30. Yodmongkol S, Chantarachindawong R, Thaweboon S, Thaweboon B, Amornasakchai T, Sriksirin T. The effects of silane – SiO₂ nanocomposite films on Candida albicans adhesion and the surface and physical properties of acrylic resin denture base material. *J Prosthet Dent*. 2014 Dec; 112(6): 1530-8.
-

31. Bourlidi S, Qureshi J, Soo S, Petridis H, Prosthod C. Effect of different initial finishes and Parylene coating thickness on the surface properties of coated PMMA. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2016 Mar; 115(3): 363-70.
 32. Blossey R. Self-cleaning surfaces--virtual realities. *Nature materials*. 2003 May;2(5):301-6.
 33. 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.
 34. 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.
 35. Ikeya K, Fukunishi M, Iwasa F, Inoue Y, Ishihara K, Baba K. 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine Polymer treatment of complete dentures to inhibit denture plaque deposition. *J Vis Exp*. 2016 Dec 26; 118.
 36. Tsuji M, Ueda T, Sawaki K, Kawaguchi M, Sakurai K. Biocompatibility of a titanium dioxide – coating method for denture base acrylic resin. *Gerodontology*. 2016 Dec; 33 (4): 539-544.
 37. Azuma A, Akiba N, Minakuchi S. Hydrophilic surface modification of acrylic denture base material by sílica coating and its influence on *Candida albicans* adherence. *J Med Dent Sci*. 2012 Mar 13; 59(1): 1-7.
-

38. Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 1990 May;116(5):546-50.
 39. Weber SC, Chapman MW. Adhesives in orthopaedic surgery. A review of the literature and in vitro bonding strengths of bone-bonding agents. *Clinical orthopaedics and related research*. 1984 Dec(191):249-61.
 40. Kim YM, Gupta BK. 2-octyl cyanoacrylate adhesive for conjunctival wound closure in rabbits. *Journal of pediatric ophthalmology and strabismus*. 2003 May-Jun;40(3):152-5.
 41. Barbosa FI, Correa DS, Zenobio EG, Costa FO, Shibli JA. Dimensional changes between free gingival grafts fixed with ethyl cyanoacrylate and silk sutures. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2009 Apr;11(2):170-6.
 42. Cobb AR, Ahmad S, Kumar M. Use of n-butyl 2-cyanoacrylate tissue adhesive to splint traumatised teeth in the emergency department. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2011 Sep;49(6):483-5.
 43. Szymaitis DW. Slide crown lengthening procedure using wide surface incisions and cyanoacrylate. *General dentistry*. 2011 Jul-Aug;59(4):e131-6.
 44. Vastani A, Maria A. Healing of intraoral wounds closed using silk sutures and isoamyl 2-cyanoacrylate glue: a comparative clinical and histologic study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2013 Feb;71(2):241-8.
 45. De Melo WM, Maximiano WM, Antunes AA, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT. Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on
-

- osteoblast cell cultures. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2013 Jan;71(1):35-41.
46. Barbizan R, Castro MV, Rodrigues AC, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira AL. Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. *PloS one*. 2013;8(5):e63260.
47. Barbosa MD, Stipp AC, Passanezi E, Greggi SL. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery: histological analysis. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2008 Sep-Oct;16(5):310-5.
48. Lee CJ, Bok SB, Bae JY, Lee HH. Comparative adaptation accuracy of acrylic denture bases evaluated by two different methods. *Dent Mater J*. 2010; 29(4): 411-7.
49. Jei JB, Mohan J. Comparative evaluation of marginal accuracy of a cast fixed partial denture compared to soldered fixed partial denture made of two different base metal alloys and casting techniques: An in vitro study. *J Indian Prosthodont Soc*. 2014; 14(1): 104-9.
50. Al-Kheraif AA. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of heat-polymerized and visible light-polymerized acrylic denture base resins. *Saudi Dent J*. 2014 Apr; 26(2):56-62.
51. Zafar MS, Ahmed N. Nanoindentation and surface roughness profilometry of poly methyl methacrylate denture base materials. *Technol Health Care*. 2014; 22(4):573-81.
52. Rangel EC GG, Cruz NC. Investigations on the stability of plasma modified silicone surfaces. *Plasmas Polym*. 2004;9:35-48.
-

53. Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of diferente exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont*. 2008; 17(4):312---7.
 54. Da Silva PM, Acosta EJ, Pinto L de 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; 54(6):e712-7
 55. Theraud M, Bedouin Y, Guiguen C, Gangneux JP. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *J Med Microbio*. 2004; 53 (Pt 10): 1013---8.
 56. Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Wuesada RM, Goldenberg S, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS yeast res*. 2008; 8(3):442—50
 57. 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*. 2001 Sep;183(18):5385-94.
 58. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002; 5(6): 608-11.
 59. Faot F, Cavalcanti Y, Bertolini M, Pinto L de R, da Silva W, Del Bel Cury. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methyl methacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. *BMC Oral Health*. 2014. 14:77
-

60. Queiroz JR, Fissmer SF, Koga-Ito CY, Salvia AC, Massi M, Sobrinho AS, Júnior LN. Effect of diamon-like carbono thin film coated acrylic resin on cândida albicans biofilm formation. *J Prosthodont*. 2013 Aug; 22(6):451-5.
 61. Peracini A, Andrade IM, Paranhos Hde F, Silva CH, de Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J*. 2010; 21(3):247-52.
 62. 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.
 63. Jackson S, Coulthwaite L, Loewy Z, Scallan A, Verran J. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J Prosthet Dent*. 2014 Oct; 112(4):988-93.
 64. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(1):99-116.
 65. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihadjo W, Van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*. 2010 Jul; 89(7):657-65.
 66. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 1995; 22(1):1-14.
 67. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun*. 1985; 47(1):11-4
-

68. Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA, Svidzinski TI. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007 Jan-Feb; 40(1):91-3.
 69. Seabra Ferreira RJ. Autologous or heterologous fibrina sealant scaffold: which is the better choice? *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014; 20:31.
 70. Tsend YC, Tabata Y, Hyon SH, Ikada Y. In vitro toxicity tests of 2—cyanoacrylate polymers by cell culture method. *J Biomed Mater Res*. 1990; 24 (10): 1355—67.
 71. Thumwanit V, Kedjarune U. Cytotoxicity of polymerized commercial cyanoacrylate adhesive on cultured human oral fibroblasts. *Aus Dent J*. 1999; 44(4):248—52.
 72. Landegren T, Risling M, Persson JK, Sonden A. Cyanoacrylate in nerve repair: transient cytotoxic effect. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 39(7):705—12.
 73. Costa LA, Jardim Pdos R, Macedo PH, Amaral Vda F, Silva AL, Barbosa Cde A. Evaluation of the abdominal wall cicatrization of rabbits exposed to nicotine and undergone abdominoplasty using nylon thread or cyanoacrylate. *Acta Cir Bras*. 2012; 27(12): 861—5.
 74. McCarron PA, Donnelly RF, Canning PE, McGovern JG, Jones DS. Bioadhesive, non—drug—loaded nanoparticles as modulators of candidal adherence to buccal epithelial cells: a potentially novel prophylaxis for candidosis. *Biomaterials*. 2004 May; 25(12): 2399-407.
 75. Trott AT. Cyanoacrylate tissue adhesives. An advance in wound care. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1997 May 21;277(19):1559-60.
-

76. Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 1990 May;116(5):546-50.
77. Raut J, Rathod V, Karuppayil M. Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*. Jpn J Med Mycol. 2010; 51:131-136.

TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais

Grupos experimentais	Nome do produto	Tempo de trabalho	Natureza
GC (Grupo Controle)	VIPI Cril ®	Nenhum	Nenhuma
ECAc	Superbond® Original	30 segundos	Sintético
ECAg	Superbond® Gel	40 segundos	Sintético
BCA	Tekbond® 932	4 minutos	Sintético
OCA	Dermabond® Alta viscosidade	2 minutos	Sintético
AT	Adesivo tisular a base de veneno de cobra (C.E.V.A.P)	2 minutos	Orgânico

Grupos experimentais com seu respectivo nome, tempo de trabalho e natureza. Os tempos de trabalho de cada revestimento foram determinados segundo o estudo piloto previamente realizado. Posteriormente ao revestimento dos espécimes, estes permaneceram 48 minutos para a polimerização completa.

Tabela 2: Valores médios de rugosidade e hidrofobicidade iniciais

Grupos	Rugosidade Inicial	Hidrofobicidade Inicial
GC	3.76 ± 0.65^a	120.29 ± 4.322^a
ECAc	2.02 ± 0.45^b	86.93 ± 4.84^b
ECAg	2.57 ± 0.67^c	109.06 ± 6.94^a
BCA	0.78 ± 0.24^d	95.57 ± 5.91^a
OCA	0.61 ± 0.17^d	102.47 ± 2.52^a
AT	3.63 ± 0.36^a	59.49 ± 12.68^c

Grupos experimentais com seus respectivos valores médios. Os resultados da rugosidade demonstraram uma diminuição dos valores em todos os grupos CAs destacando-se os grupos BCA e OCA. Os dados da hidrofobicidade também evidenciaram uma diminuição em todos os grupos sobressaindo, neste caso o grupo AT.

Gráfico 1: Rugosidade inicial antes da imersão em biofilme de *C. albicans*. **Gráfico 2:** Hidrofobicidade inicial antes da imersão em biofilme de *C. albicans*.

Tabela 3: Valores médios de rugosidade e hidrofobicidade após 7, 14 e 30 dias de imersão em biofilme de *C. albicans*.

Grupos	Período de avaliação (Dias)	Rugosidade	Valores de p	Hidrofobicidade final	Valores de p
GC	0	$3.78 \pm 0.52^{\beta}$		$120.28 \pm 4.36^{\beta}$	
	7	$1.76 \pm 0.25^{*}$	p = 0	$57.06 \pm 4.2^{*}$	p = 0
	14	$1.88 \pm 0.23^{*}$	p = 0	$58.23 \pm 8.7^{*}$	p = 0
	30	$1.76 \pm 0.24^{*}$	p = 0.029	$52.27 \pm 39.38^{*}$	p = 0.022
ECAc		$2.01 \pm 0.43^{\beta}$		$86.93 \pm 4.28^{\beta}$	
	7	$0.88 \pm 0.23^{*}$	p = 0.001	$56.47 \pm 5.1^{*}$	p = 0.001
	14	$0.98 \pm 0.33^{*}$	p = 0.004	$61.16 \pm 8.91^{*}$	p = 0.003
	30	$1.17 \pm 0.25^{*}$	p = 0.005	$83.55 \pm 2.5^{\beta}$	p = 0.89
ECAg		$2.57 \pm 0.66^{\beta}$		$109.06 \pm 6.51^{\beta}$	
	7	$1.29 \pm 0.13^{*}$	p = 0.006	$90.79 \pm 3.96^{a*}$	p = 0.003
	14	$1.09 \pm 0.19^{*}$	p = 0.04	$59.33 \pm 4.83^{b*}$	p = 0
	30	$1.36 \pm 0.22^{*}$	p = 0.003	$57.89 \pm 5.29^{b*}$	p = 0
BCA	0	0.78 ± 0.23		$95.58 \pm 4.44^{\beta}$	
	7	0.82 ± 0.45	p = 0.91	$60.62 \pm 4.56^{*}$	p = 0
	14	0.78 ± 0.43	p = 0.75	$60.75 \pm 7.98^{*}$	p = 0.007
	30	0.84 ± 0.41	p = 0.87	$102.92 \pm 6.16^{\beta}$	p = 0.53
OCA	0	$0.61 \pm 0.16^{\beta}$		$102.47 \pm 2.63^{\beta}$	
	7	$0.34 \pm 0.14^{*}$	p = 0.001	$72.93 \pm 9.7^{*}$	p = 0.002
	14	$0.36 \pm 0.07^{*}$	p = 0.009	$97.28 \pm 5.41^{\beta}$	p = 0.2
	30	$0.43 \pm 0.14^{*}$	p = 0.027	$84.58 \pm 9.11^{*}$	p = 0.007
AT	0	$3.63 \pm 0.35^{\beta}$		59.49 ± 12.29	
	7	$1.77 \pm 0.15^{*}$	p = 0	50.72 ± 12.83	p = 0.1
	14	$2.05 \pm 0.12^{*}$	p = 0.002	51.69 ± 5.73	p = 0.8
	30	$1.69 \pm 0.21^{*}$	p = 0.001	44.35 ± 13.45	p = 0.1

Os resultados da rugosidade demonstraram uma diminuição dos valores em todos os grupos destacando-se o grupo OCA e o AT com os menores e maiores valores nos 3 períodos de avaliação. Os dados da hidrofobicidade também evidenciaram uma diminuição em todos os grupos sobressaindo, neste caso, o GC e o AT com os menores valores nos 3 períodos de avaliação.

Gráfico 3: Rugosidade Inicial e final após 7, 14 e 30 dias de imersão em biofilme de *C. albicans*.

Gráfico 4: Hidrofobicidade inicial e final após 7, 14 e 30 dias de imersão em biofilme de *C. albicans*.

ILUSTRAÇÕES E LEGENDAS

Figura 1: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre os espécimes após 7 dias de imersão obtidas através de microscopia confocal. Em todos os grupos identifica-se a presença de células fúngicas remanescentes na forma de levedura e de hifa. As imagens obtidas mostraram que houve uma diminuição dos fungos no grupo dos cianoacrilatos, destacando-se o ECAc como o material que apresentou menos células aderidas viáveis após 7 dias. Paralelamente os grupos GC e AT demonstraram uma quantidade considerável de células fúngicas aderidas.

Figura 2: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre os espécimes após 14 dias de imersão obtidas através de microscopia confocal. Na imagem ECAC observa-se a presença de células fúngicas viáveis em forma de levedura. Já nos grupos GC, ECAG, BCA, OCA e AT, identifica-se a presença de células fúngicas viáveis remanescentes na forma de levedura e de hifa. Os resultados mostraram que a diminuição dos fungos permanecia no grupo dos cianoacrilatos, destacando-se, novamente, o ECAC como o material que apresentou menos células aderidas viáveis após 14 dias. Paralelamente os grupos GC e AT continuavam apresentando uma abundante quantidade de células fúngicas aderidas.

Figura 3: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre os espécimes após 30 dias de imersão obtidas através de microscopia confocal. Em todas as imagens identifica-se a presença de células fúngicas remanescentes na forma de levedura e de hifa. As imagens mostraram uma diminuição dos fungos nos grupos dos cianoacrilatos, destacando-se esta vez, o ECAg como o material que não apresentou células aderidas viáveis após 28 dias. Paralelamente os grupos GC e AT permaneceram com uma abundante quantidade de células fúngicas aderidas.

3 DISCUSSÃO

3 DISCUSSÃO

A rugosidade e hidrofilicidade superficial das RATs facilitam a adesão e retenção do biofilme microbiano à superfície e, deste modo, procuram-se materiais que possam melhorar as características superficiais das RATs com o fim de serem utilizados como meios preventivos frente à colonização e desenvolvimento microbiano (SILVA et al., 2016; JACKSON S et al., 2014; QUEIROZ et al., 2013; PERACINI et al., 2010; TEUGHEL et al., 2006; BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997; VERRAN; MARYAN, 1997; QUIRYNEN et al., 1990; MINAGI et al., 1985; NIKAWA et al., 1992; RADFORD et al., 1998).

Neste estudo, a modificação da superfície da RAT por meio dos revestimentos a base de CAs conseguiram reduzir significativamente a rugosidade superficial além de manter as características hidrofóbicas antes da imersão em biofilme de *C. albicans*. Dentre os CAs testados, o grupo OCA (0.61 μm , 102.47°) foi o adesivo que apresentou os melhores valores, seguidamente dos grupos BCA (0.78 μm , 95.57°), ECAC (2.02 μm , 86.93°) e ECAG (2.57 μm , 109.06°), rejeitando-se dessa forma a hipótese nula para estes revestimentos. Caso contrário ocorreu com o grupo AT (3.63 μm , 59.49°), não apresentando nenhuma diferença nos valores médios de rugosidade quando comparados com o GC (3.76 μm), além de demonstrar a capacidade de tornar hidrofílica a superfície da RAT (59.49°) aceitando-se dessa forma, a hipótese nula para este adesivo.

No que se refere à rugosidade, as diferenças encontradas entre os grupos CAs podem ser explicadas por meio da sua consistência e tempo de polimerização. O revestimento ECAC é de consistência líquida de baixa viscosidade, no entanto sua polimerização termina aos 30 segundos, tempo que poderia ser insuficiente para espalhar-se sobre a superfície. Por outro lado, observa-se que o revestimento ECAG apresentou valores estatisticamente maiores do que o grupo convencional e isto deve-se ao fato de possuir uma polimerização rápida (40 segundos) e que, sua consistência em gel, dificulta mais o espalhamento do adesivo, ficando mais rugosa. Os revestimentos BCA e OCA apresentaram também uma consistência semelhante ao ECAC, no entanto o tempo de polimerização destes foi maior, facilitando assim um melhor espalhamento sobre a superfície.

Os valores achados neste estudo são compatíveis aos encontrados em estudos anteriores (SILVA et al., 2016; BOURLIDI et al., 2016; YODMONGKOL et al., 2014;

QUEIROZ et al., 2013; ZISSIS et al., 2000) cujos valores médios de rugosidade encontravam-se acima dos 0,2µm porém, ao diminuir estes valores das RATs, haverá uma diminuição significativa de células aderidas à superfície (QUIRYNEN et al., 1990; RADFORD, 1999).

No que se refere à hidrofobicidade, a literatura evidencia diferenças entre os valores de ângulo de contato das RATs que variam entre os 57-90°, dependendo da marca comercial e o protocolo de polimerização: Lucitone (68.64°), Meliodent (78.65°) e VIPi wave (70.23). No presente estudo a RAT (Vipi Cril Plus) demonstrou maiores valores hidrofóbicos na sua superfície, atingindo uma média de 120.29°. Diante disso se hipotetiza que as diferenças entre os valores da RAT se devem à composição química de cada resina, aos distintos processos de polimerização e às diferentes metodologias utilizadas para a obtenção de dados: Técnica da gota sésil através do goniômetro, técnica de força de molhabilidade por meio do tensiômetro e ângulo de contato dinâmico (SARDIN et al., 2004; WEERKAMP; VAN DER MEI; BUSSCHER, 1985; SIPAHI; ANIL; BAYRAMLI, 2001; ACOSTA et al., 2011; LAZARIN et al., 2013; BOURLIDI et al., 2016).

Enquanto à característica facilitadora de adesão de *C. albicans*, a literatura mostra-se de maneira controversa e ambígua frente a esta questão. Segundo BUSSCHER et al. (2010) a hidrofobicidade dos materiais são importantes só nos estágios iniciais da adesão bacteriana, porém sua influência diminui com a formação prolongada do biofilme. Por outro lado, pesquisas relatam que os microrganismos tendem a aderir-se às superfícies com a mesma energia superficial, quer dizer, quanto mais próximas a energia livre do substrato e do micro-organismo, maior a probabilidade de ocorrer aderência (MINAGI et al. 1985; WEERKAMP et al., 1985; SIPAHI; ANIL. BAIRAMLI, 2001; KLOTZ; DRUTZ; ZAJIC, 1985). Diante disso, alguns estudos (MINAGI et al., 1985, KOCH; BURGUERS; HAHNEL, 2013; KAGN et al., 2013, QUIRYNEN; BOLLEN, 1995) afirmam que os substratos hidrofóbicos dificultariam a adesão microbiana. Em controvérsia outros estudos (BOURLIDI et al., 2016; ZHOU et al., 2010; LAZARIN et al., 2013; KLOTZ et al., 1985) encontraram que há uma relação linear entre as células aderidas e as superfícies hidrofóbicas dos substratos. Nessa situação autores avaliaram a hidrofobicidade celular da *C.albicans* (PEREIRA et al., 2016; TAMURA et al., 2007) com o intuito de avaliar os fatores de virulência deste microrganismo demonstrando que sua parede celular apresenta propriedades hidrofílicas; assim sendo o presente estudo considerou que superfícies mais hidrofóbicas dificultariam o preveniriam a adesão da *C.albicans* sobre as superfícies das RATs.

Estes dados foram corroborados por meio das imagens realizadas em MC, as quais demonstraram uma menor quantidade de células aderidas nas superfícies tratadas com CAs concluindo assim que, superfícies mais lisas e com características hidrofóbicas, dificultariam a adesão e o desenvolvimento do biofilme microbiano. De todos os CAs avaliados, evidenciou-se que o grupo ECAC foi o adesivo que apresentou um menor acúmulo de biofilme nos 3 períodos avaliados e o grupo ECAG, aos 30 dias, não apresentou nenhuma célula aderida à superfície. Isto pode ser justificado através das decorrências citopáticas dos CAs às células, cujos efeitos tendem a diminuir dentro dos primeiros 14 dias e permanecer com reações baixas por 28 dias (COSTA et al., 2012; DE MELO et al., 2013; LANDEGREN et al., 2010). Essa resultante se deve à liberação de subprodutos como o formaldeído e os compostos cianoacetato, que segundo alguns estudos (THUMWANIT; KEDJARUNE, 1999; TSEND et al., 1990), poderiam estar relacionados a uma atividade antifúngica. Por outro lado, outra possibilidade é que haja ocorrido alguma modificação na composição química dos revestimentos ou que estes sejam incapazes de estabelecer fortes interações com a RAT, produzindo assim o desprendimento das camadas dos revestimentos com às células aderidas à superfície (MC CARRON et al., 2004). Apesar das limitações deste estudo, isto foi evidenciado nas imagens de 28 dias dos grupos ECAG e OCA visto que parecem apresentar sinais de degradação e envelhecimento, que posteriormente poderiam facilitar a retenção microbiana. De outra forma os grupos BCA e OCA demonstraram uma maior quantidade de células remanescentes sobre a superfície quando comparados com os grupos ECAC e ECAG, portanto suspeita-se que estes revestimentos demorariam em degradar-se, além de não liberar subprodutos que poderiam ser daninhos para às células, já que possuem cadeias radicais mais longas o que tornariam mais resistentes suas superfícies (TROTT, 1997).

Pode-se observar que tanto o grupo GC como o grupo AT apresentaram maiores acúmulos de biofilme microbiano em comparação com os CAs. Isto pode ser justificado pelos altos valores de rugosidade ($> 2 \mu\text{m}$) que apresentaram (ZISSIS et al., 2000; SILVA et al., 2016; QUIRYNEN et al., 1990, TEUGHELLS et al., 2006). Além disso se evidenciou uma maior aderência de células viáveis no grupo AT aos 7 e 14 dias do que no grupo GC, provavelmente pela presença de proteínas na sua composição que poderiam ter funcionado como reservatórios de nutrientes para o desenvolvimento da *C. albicans* sobre o substrato (SEABRA FERREIRA, 2014).

Enquanto aos resultados após imersão em biofilme de *C. albicans*, foi evidenciado que a hidrofobicidade do grupo GC diminuiu de maneira significativa, indicando assim que o biofilme de *C. albicans* consegue modificar a superfície da RAT, tornando-a hidrofílica para

provavelmente se aderir com maior facilidade à superfície. Esses dados foram corroborados com os resultados observados no grupo AT, cuja superfície hidrofílica não apresentou mudanças significativas. Resultados próximos ocorreram com os grupos CAs, onde se pôde evidenciar menores ângulos de contato sobre a RAT, indicando assim que as superfícies diminuíram sua hidrofobicidade. Porém, a diferença do grupo GC, os CAs revelaram uma maior resistência à queda destes valores, sobressaindo o grupo OCA com características hidrofóbicas nos 3 períodos avaliados. Deste modo aceitou-se a hipótese nula para todos os materiais testados, exceto para o grupo AT.

No que refere à rugosidade, todos os grupos testados reduziram seus valores, exceto o grupo BCA que apresentou uma maior resistência, dureza e interação com as RATs. A resistência à mudança que mostrou este último adesivo pode ser justificada através das cadeias radicais longas que apresenta este material (BCA - $R=C_4H_9$) (TORIUMI et al., 1990) outorgando-lhe uma maior resistência à degradação em comparação aos os grupos com cadeias radicais curtas (ECAc e ECAG) (TROTT, 1997), em vista disto, rejeitou-se a hipótese nula para este adesivo.

Atualmente não existe na literatura estudos que tenham avaliado os efeitos da *C. albicans* sobre a superfície da RAT, no entanto existem trabalhos afirmando que este microrganismo possui a capacidade de se adaptar às condições ambientais às quais é submetida sendo capaz de regularizar a hidrofobicidade da sua parede celular (RAUT; RATHOD; KARUPPAYIL, 2010). Porém segundo os nossos achados, parece que a *C. albicans* não só possui a capacidade de adaptar-se ao ambiente na que ela se encontra senão também de condicionar às superfícies dos substratos a serem colonizados. Dessa forma, se hipotetiza que a imersão em biofilme de *C. albicans* degrada às superfícies testadas tornando-as menos rugosas (exceto o BCA) e mais hidrofílica, com o fim de melhorar sua adesão e desenvolvimento.

Foi demonstrado que uma menor rugosidade e uma maior hidrofobicidade da superfície da RAT através do tempo, são fatores importantes a serem considerados com o fim de inibir a formação de biofilme de *C. albicans*. Porém existem outras variáveis que tem quer consideradas como a hidrofobicidade da parede celular do fungo (HAZEN; GLEE, 1995; KLOTZ; DRUTZ; ZAJIC, 1985) e a adsorção de proteínas salivares ao substrato (MINAGI et al., 1985; NIKAWA et al., 1993; ZISSIS et al., 2000; DAVIDI et al., 2008; RADFOR et al., 19998; EDGERTON et al., 1993; BYRD et al., 2014).

Diante do exposto, o estudo concluiu que todos os grupos CAs são produtos que conseguem melhorar as características superficiais das RATs, já que inicialmente, sem a

presença de biofilme de *C. albicans*, acabam preenchendo as irregularidades encontradas sobre a superfície além de manter sua hidrofobicidade.

Dentre os materiais testados o OCA foi o adesivo que apresentou uma menor rugosidade e uma maior hidrofobicidade nos 3 períodos avaliados. Além disto, o BCA foi o adesivo que demonstrou uma melhor resistência física frente ao biofilme de *C. albicans*, sugerindo assim a realização de mais pesquisas que avaliem sua resistência e eficácia em inibir o desenvolvimento microbiano sobre a RAT por meio de longos períodos de avaliação.

Finalmente, se recomenda que novos estudos se direcionem na procura de materiais ou tratamentos superficiais que atinjam uma menor rugosidade além de manter ou aumentar os valores hidrofóbicos das superfícies da RAT a curto e longo prazo, com o fim de dificultar a adesão e o desenvolvimento microbiano. Cabe salientar que os materiais testados devem ser avaliados não só frente a desafios biológicos, senão também aos desafios químicos e mecânicos que simulem os métodos de higienização empregados pelos pacientes usuários de PTs.

4 CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia adotada e os resultados obtidos, pode-se concluir com o estudo que:

- Inicialmente, os valores médios de rugosidade para todos os grupos cianoacrilatos diminuíram significativamente quando comparados com os grupos GC e AT, apresentando os menores valores médios os grupos OCA e BCA.
 - Observou-se que inicialmente, o grupo controle, semelhantemente aos CAs apresentaram características hidrofóbicas, exceção feita ao grupo AT que demonstrou uma superfície hidrofílica.
 - O teste da rugosidade após imersão em biofilme de *C. albicans* demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa dos valores médios em todos os grupos após 7, 14 e 30 dias, exceto no grupo BCA.
 - O ensaio da hidrofobicidade evidenciou uma diminuição estatisticamente significativa nos grupos GC e ECAg após 7, 14 e 30 dias de imersão em biofilme de *C. albicans*. A superfície do grupo GC tornou-se hidrofílica nos 3 tempos e a superfície do grupo ECAg apresentou características hidrofóbicas até o 7 dia, diferentemente dos 14 e 30 dias de imersão onde demonstrou uma superfície hidrofílica.
 - Os grupos ECAc e BCA demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa nos 7 e 14 dias após da imersão em biofilme de *C. albicans*, revelando uma superfície hidrofílica. Já aos 30 dias não houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados com os valores iniciais, mostrando superfícies com propriedades hidrofóbicas. Por outro lado, o grupo OCA preservou propriedades hidrofóbicas nos 3 períodos avaliados. Não
-

houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de ângulo de contato iniciais e finais do grupo AT após imersão em biofilme de *C. albicans*.

- A análise das imagens em MC mostrou uma maior redução de células viáveis nos grupos ECAC e ECAG e uma maior adesão no grupo AT.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Ali AA, Alharbi FA, Suresh CS. Effectiveness of coating acrylic resin dentures on preventing *Candida* adhesion. *J Prosthodont*. 2013 Aug; 22 (6):445-50.

Al-Dwairi ZN, Al-Quran FA, Al-Omari OU. The effect of antifungal agents on surface properties of poly (methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. *J Prosthodont Res*. 2012 Oct; 56(4):272-80.

Barbizan R, Castro MV, Rodrigues AC, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira AL. Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. *PloS one*. 2013;8(5):e63260.

Barbosa MD, Stipp AC, Passanezi E, Greggi SL. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery: histological analysis. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2008 Sep-Oct;16(5):310-5.

Byrd WC, Schwartz-Baxter S, Carlson J, et al. Role of salivary and candida proteins in denture stomatitis: an exploratory proteomic analysis. *Mol Biosyst*. 2014; 10: 2299-2304.

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.

Bourlidi S, Qureshi J, Soo S, Petridis H, Prosthodont C. Effect of different initial finishes and Parylene coating thickness on the surface properties of coated PMMA. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2016 Mar; 115(3): 363-70.

Bulad K, Taylor RL, Verran J, McCord JF. Colonization and penetration of denture soft lining materials by *Candida albicans*. *Dent Mater*. 2004 Feb; 20(2):167-75.

Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihadjo W, Van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*. 2010 Jul; 89(7):657-65.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *C. albicans*. *Trends Microbiol*. 2001 Jul;9(7):327-35.

Carter GM, Kerr MA, Shepherd MG. The rational management of oral candidosis associated with dentures. *N Z Dent J*. 1986 Jul; 82(369):81-4.

Cobb AR, Ahmad S, Kumar M. Use of n-butyl 2-cyanoacrylate tissue adhesive to splint traumatised teeth in the emergency department. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2011 Sep;49(6):483-5.

Costa LA, Jardim Pdos R, Macedo PH, Amaral Vda F, Silva AL, Barbosa Cde A. Evaluation of the abdominal wall cicatrization of rabbits exposed to nicotine and undergone abdominoplasty using nylon thread or cyanoacrylate. *Acta Cir Bras*. 2012; 27(12): 861—5.

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 Costa AS, Machado FCA, Pereira A BP, Carreiro AP, Ferreira MF. Technical quality and satisfaction related to full conventional dentures. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2013; 18(2): 453-60.

Darvell BW. Surfaces. In: Darvell BW, editor. *Materials Science for Dentistry*. 6th ed. Hong Kong: Woodhead.

Das I., Nightingale P., Patel M., Juma P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int. J. Infect. Dis*. 2011 Nov; 15(11):e759-63.

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

De Melo WM, Maximiano WM, Antunes AA, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT. Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on osteoblast cell cultures. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2013 Jan;71(1):35-41.

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

Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trial. *J Dent*. 2014 feb; 42(2):99-106.

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

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.

Hazen KG, Glee PM. Cell Surface Hydrophobicity and medically important fungi. *Curr Top Med Mycol*. 1995; 6:1-31

Iuan FC, Thomazini IA, Gianini MJ, Viterbo F, Toscano E, Moraes RA, et al. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. *São Paulo Med J*. 1995; 113(5):1000-2.

Jackson S, Coulthwaite L, Loewy Z, Scallan A, Verran J. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J Prosthet Dent*. 2014 Oct; 112(4):988-93.

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 Odontol Scand*. 2013 Jan; 71(1): 241-8.

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

Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun*. 1985; 50(1):97-101.

Koch C, Burguers R, Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation in the surface of denture base materials. *Gerodontology*. 2013 Dec; 30(4): 309-13.

Lalla RV, Dongari-Bagtzoglou A. Antifungal medications or disinfectants for denture stomatitis. *Evid Based Dent*. 2014 Jun; 15(2):61-2.

Landegren T, Risling M, Persson JK, Sonden A. Cyanoacrylate in nerve repair: transient cytotoxic effect. *Int J Oral Maxillof Surg*. 2010; 39(7):705---12.

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. *Arch Oral Biol*. 2013 Jan; 58 (1):1-9

Martinez R.F., Jaimes-Aveldanez A., HernandezPerez F., Arenas R., Miguel G.F. Oral Candida spp carriers: its prevalence in patients with type 2 diabetes mellitus. *An Bras Dermatol.* 2013 Mar-Apr;88(2):222-5.

Mayahara M, Kataoka R, Arimoto T, Tamaki Y, Yamaguchi N, Watanabe Y, Ymasaki Y, Miyazaki T. Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. *J Investig Clin Dent.* 2014 Nov; 5(4):307-12.

Mc Carron PA, Donnelly RF, Canning PE, McGovern JG, Jones DS. Bioadhesive, non—drug—loaded nanoparticles as modulators of candida adherence to buccal epithelial cells: a potentially novel prophylaxis for candidiasis. *Biomaterials.* 2004; 25(12):2399--407

Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun.* 1985; 47(1):11-4

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.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sqavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida* related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008 Nov; 35(11):836-46.

Nikawa H, Hayashi S, Nikawa Y, Hamada T, Samaranayake LP. Interactions between denture lining material, protein pellicles and *Candida albicans*. *Arch Oral Biol.* 1993 Jul; 38(7):631-4.

Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent.* 1992a; 68(5): 804-8.

Peracini A, Andrade IM, Paranhos Hde F, Silva CH, de Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J.* 2010; 21(3):247-52.

Pereira CA, Domingues N, Araújo MI, Junqueira JC, Back-Brito GN, Jorge AO. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patient with denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 May; 85(1):66-72.

Pereira-Cenci T, Cury AADB, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RCM. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007; 20: 308-10.

Pinke KH, Freitas P, Viera NA, Honório HM, Porto VC, Lara VS. Decreased production of proinflammatory cytokines by monocytes from individuals presenting *Candida*-associated denture stomatitis. *Cytokine*. 2016 Jan; 77:145-51.

Pinto L de R, Acosta EJ, Távora FF, da Silva PM, Porto VC. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard reline acrylic resins. *Gerodontology*. 2010 Jun; 27(2): 147-53.

Queiroz JR, Fissmer SF, Koga-Ito CY, Salvia AC, Massi M, Sobrinho AS, Júnior LN. Effect of diamon-like carbono thin film coated acrylic resin on *cândida albicans* biofilm formation. *J Prosthodont*. 2013 Aug; 22(6):451-5.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, Van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol*. 1990 Mar; 17(3):138-44.

Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 1995; 22(1):1-14.

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

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

Rahal JS, Mesquita MF, Henriques GE, Nobilo MA. Surface roughness of acrylic resins submitted to mechanical and chemical polishing. *J Oral Rehabil*. 2004; 31(11): 1075-9.

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.

Raut J, Rathod V, Karuppayil M. Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*. Jpn J Med Mycol. 2010; 51:131-136.

Rodriguez Acosta EJ, da Silva PM, Jacobina M, Lara VS, Neppelenbroek KH, Porto VC. *Candida albicans* adherence to denture base material: chemical disinfection and the effect of acquired salivary pellicle formation. Journal of prosthodontics. 2015 Apr; 24(3):200-6.

Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinstein N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. Clin Oral Investig. 2007 Jun; 11(2):143-7.

Sardin S, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. J Oral Rehabil. 2004 Feb; 31(2):140-8.

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

Seabra Ferreira RJ. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2014; 20:31.

Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Río-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. Int J Prosthodont. 2005 Sep-Oct; 18(5): 392-8.

Sesma N, Morimoto S. Estomatite Protética: Etiologia, tratamento e aspectos clínicos. Journal of Bi dentistry and Biomaterials. 2011 Set-Fev; 2: 24-29.

Silva MJ, de Oliveira DG, Marcillo OO, Neppelenbroek KH, Lara VS, Porto VC. Effect of denture-coating composite on *Candida albicans* biofilm and surface degradation after disinfection protocol. Int Dent J. 2016 Jan 7.

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

Sollecito TP, Stoppler ET. Clinical approaches to oral mucosal disorders. Dental clinics of North America. 2014 Nov; 98(6): 1323-52.

Srinivasan M, Gulabani M. A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with oral rinse in complete denture patients. Indian J Dent Res. 2010 Jul-Sep; 21(3): 353-6.

Stoopler ET, Sollecito TP. Oral mucosal diseases: evaluation and management. *Med Clin North Am.* 2014 Nov;98(6) : 1323-52.

Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA, Svidzinski TI. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Jan-Feb; 40(1):91-3.

Tanwar J., Das S., Fatima Z., Hameed S. Crusade for opportunity: *Candida albicans* from commensalism to pathogenicity. *J. Hum. Dis.* 2013; 112: 160-167.

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.

Thumwanit V, Kedjarune U. Cytotoxicity of polymerized commercial cyanoacrylate adhesive on cultured human oral fibroblasts. *Aus Dent J.* 1999; 44(4):248—52.

Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery.* 1990 May;116(5):546-50.

Trott AT. Cyanoacrylate tissue adhesives. An advance in wound care. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 1997 May 21;277(19):1559-60.

Tsend YC, Tabata Y, Hyon SH, Ikada Y. In vitro toxicity tests of 2—cyanoacrylate polymers by cell culture method. *J Biomed Mater Res.* 1990; 24 (10): 1355—67.

Vastani A, Maria A. Healing of intraoral wounds closed using silk sutures and isoamyl 2-cyanoacrylate glue: a comparative clinical and histologic study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2013 Feb;71(2):241-8. P

Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997 May; 77(5): 535-9.

Weerkamp AH, Van Der Mei HC, Busscher HJ. The surface free energy of oral streptococci after being coated with saliva and its relation to adhesion in the mouth. *J Dent Res.* 1985 Oct; 64(10):1204-10.

Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil.* 2005 Jul; 32(7):518-25.

Yodmongkol S, Chantarachindawong R, Thaweboon S, Thaweboon B, Amornasakchai T, Srihirin T. The effects of silane – SiO₂ nanocomposite films on *Candida albicans* adhesion and the surface and physical properties of acrylic resin denture base material. *J Prosthet Dent*. 2014 Dec; 112(6): 1530-8.

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

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. *Arch Biol*. 2010; 55(6): 401-9.

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

ANEXO

Tipos de Artigos

Os artigos são classificados da seguinte maneira: Relatório de Pesquisa/Casos Clínicos, Relatório Clínico, Técnica Dentária, Revisão Sistemática, ou Conclhos dos Nossos Leitores. Seções necessárias para cada tipo de artigo são listados na ordem em que devem ser apresentados.

RELATÓRIO DE PESQUISA/ESTUDO CLÍNICO

O relatório da pesquisa não deve ser mais de 10-12 páginas digitadas em espaço duplo e deve ser acompanhado por não mais de 12 ilustrações de alta qualidade. Evite o uso de forma de esboço (ou seja enumerações e/ou frases ou parágrafos com marcadores). O texto deve ser escrito em frases completas e em forma de parágrafo.

- **Abstract (Abstrato):** (aproximadamente 250 palavras): Crie um resumo estruturado com os seguintes subseções: *Statement of the Problem* (Declaração do Problema), *Objective* (Objetivo), *Materials and Methods* (Métodos e Materiais), *Results* (Resultados) e *Conclusions* (Conclusões). O abstrato deve conter detalhes suficientes para descrever o experimento e os variáveis do projeto. O tamanho da amostra, os controles, o método de medição, standardização, confiabilidade examinador, e método estatístico utilizado com nível de significância associado deve ser descritos na seção de Materiais e Métodos. Valores reais devem ser fornecido na seção de Resultados.
- **Clinical Implications (Implicações Clínicas):** Em 2-4 frases, descreva o impacto dos resultados do estudo sobre prática clínica.
- **Introduction (Introdução):** Explique o problema completamente com precisão. Resuma a literatura relevante, e identifique qualquer viés em estudos anteriores. Declare claramente o objetivo do estudo e a hipótese da pesquisa no final da introdução. Observe que, numa profunda revisão da literatura, a maioria das referências (se não todas) devem ser citadas na seção Materiais e Métodos e/ou na Introdução.
- **Materials and Methods (Materiais e Métodos):** No parágrafo inicial, forneça uma visão geral do experimento. Forneça informações completas de todos os produtos de fabricação e instrumentos utilizados, entre parênteses ou em uma tabela. Descreva o que foi medido, como foi medido, e as unidades de medida utilizadas. Liste os critérios para julgamento quantitativo. Descreva o designo experimental e variáveis, incluindo critérios definidos para controlar variáveis, standardizar os testes, a alocação de espécimes/sujeitos a grupos (método de randomização), o tamanho total da amostra, controles, calibração dos examinadores, e confiabilidade de instrumentos e examinadores. Descreva como o tamanho das amostras foi determinada (por exemplo, com a análise de força (*power analysis*)). Evite o uso de números para identificar grupos. Em vez, use abreviações ou códigos que claramente indicaram as características do grupo e assim, os grupos serão mais significativo para o leitor. Os testes estatísticos e níveis de significância associado devem ser descrito no final desta seção.
- **Results (Resultados):** Descreva com precisão e brevemente, na mesma ordem que os testes foram descritos na seção de Materiais e Métodos. Para uma listagem extensa, os dados poderão ser apresentados em forma tabular ou forma gráfica para ajudar o leitor. Para *1-way ANOVA* apresente *df*, e valores de *F* e *P* nas áreas apropriada no texto. Para todas as outras *ANOVAs*, de acordo com as orientações, forneça a tabela ANOVA. Descreva os resultados e as tendências mais significativas. Texto, tabelas e figuras não devem repetir ao outro. Resultados notados como significativos devem ser validados por dados atuais e valores *P*.

- **Discussion (Discussão):** Discuta os resultados do estudo, em relação à hipótese e a relevante literatura. A discussão deve começar por explicar se sim ou não há suporte a rejeitar a hipótese nula. Se os resultados não concordam com outros estudos e/ou com opiniões aceites, declare como, e porquê os resultados são diferentes. Resultados concordantes com outros estudos também devem ser declarados. Identifique as limitações do seu estudo e sugere pesquisas futuras.
- **Conclusion (Conclusão):** Liste concisamente conclusões da pesquisa que possam ser retiradas do seu estudo, não simplesmente reafirmar os resultados. As conclusões devem ser pertinentes aos objetivos e justificado pelos dados. Na maioria das situações, as conclusões são só verdade para a população do experimento. Todas as conclusões devem ser acompanhadas por análises estatísticas
- **References (Referências):** Consulte a página 9 para obter mais orientações, página 22 para amostras.
- **Tables (Tabelas):** Construir tabelas de acordo com as orientações na página 11.
- **Legends for Illustrations (Legendas para as Ilustrações):** Descreva de forma concisa cada ilustração sem diretamente duplicar o texto. Consulte a página 13 para obter mais orientações; página 23 para a página de amostra de legendas.

RELATÓRIO CLÍNICO

O relatório clínico descreve os métodos do autor para cumprir um tratamento difícil dum paciente; não deve ser mais de 4 a 5 páginas, espaço duplo, e deve ser acompanhado por não mais do que 8 ilustrações de alta qualidade. Em algumas situações, o editor pode aprovar a publicação de figuras adicionais se contribuírem significativamente ao manuscrito.

- **Abstract (Abstrato):** Forneça um curto abstrato, sem estrutura, num parágrafo que brevemente resume o problema encontrado e tratamento administrado.
- **Introduction (Introdução):** Resuma a literatura relevante para o problema encontrado, incluindo referências de tratamentos e protocolos padrão. Por favor note que a maioria das referências, se não todas, devem ser citadas na introdução e/ou na seção Relatório Clínico.
- **Clinical Report (Relatório Clínico):** Descreva o paciente, o problema com o qual ele/ela apresentou, e qualquer história médica ou odontológica relevante. Descreva as várias opções de tratamento e as razões para tratamento escolhido. Descreva completamente o tratamento, a duração do período de acompanhamento, e melhorias notáveis resultado do tratamento. Esta seção deve ser escrito no passado e em forma de parágrafo.
- **Discussion (Discussão):** Comente sobre as vantagens e desvantagens do tratamento escolhido e descreva qualquer contraindicações do tratamento. Se o texto torna repetitivo, omita a discussão.
- **Summary (Sumário):** Resume brevemente o tratamento do paciente.
- **References (Referências):** Selecione e escreva referências bibliográficas de acordo com as orientações da página 10.
- **Legends for illustrations (Legendas para as ilustrações):** Descreva de forma concisa cada ilustração sem diretamente duplicar o texto principal.

TÉCNICA DENTÁRIA

Um artigo sobre uma técnica dentária deve ser apresentada num formato de passo-a-passo, um procedimento único, útil para profissionais de odontologia. Não deve ser mais de 4 a 5 páginas digitadas, em espaço duplo, e ser acompanhado por não mais de 8 ilustrações de alta qualidade. Em algumas